



## **DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICA E INGENIERÍA**

# **ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO Y ELECTROQUÍMICO DEL CEFTIOFUR Y DE SU INTERACCIÓN CON LA $\beta$ -CICLODEXTRINA**

Tesis que presenta

**Giovanni Manuel Ramos Reyes**

**2153800369**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias (Ingeniería de Materiales)**

Asesoras:

Dra. Silvia Corona Avendaño

Dra. Dafne Sarahia Guzmán Hernández

Jurado calificador:

Presidente(a):

Secretario(a):

Vocal:

Vocal:

Ciudad de México, México

marzo de 2018

**ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO Y  
ELECTROQUÍMICO DEL CEFTIOFUR Y DE SU  
INTERACCIÓN CON LA  $\beta$ -CICLODEXTRINA**

## II RESUMEN

Ceftiofur es uno de los antibióticos más utilizados para tratar infecciones en ganado, su dosificación indiscriminada promueve la aparición de trazas de éste en productos como la carne y la leche, que al ser consumidos permiten la generación de multirresistencia bacteriana a fármacos de la misma familia. Para atacar este problema, pocos métodos han sido desarrollados para la cuantificación de ceftiofur, no obstante, estos son métodos costosos, utilizan largos tiempos de análisis, emplean materiales tóxicos o explican de manera poco robusta los resultados obtenidos. Es por ello, que en este trabajo se presenta un estudio espectrofotométrico y electroquímico realizado a ceftiofur, así como de su interacción con la  $\beta$ -ciclodextrina, una molécula que ha demostrado coadyuvar en el estudio de diversos analitos.

En el Capítulo 1 de este documento, se presenta una descripción de la problemática a la cual está sujeta ceftiofur, las medidas que instituciones regulatorias internacionales han tomado para atacarla; los trabajos reportados enfocados al estudio de la molécula, así como una descripción de las ventajas derivadas del empleo de la  $\beta$ -ciclodextrina, en solución y a través de la formación de películas poliméricas en superficies electródicas. En los Capítulos 2 y 3, por medio de espectrofotometría UV-Vis, se presenta la caracterización del espectro de absorción de CF, la evaluación de la estabilidad de la molécula en función del tiempo por efecto de las condiciones experimentales, la determinación de las constantes de acidez de la molécula, y de inclusión, producto de la interacción de ceftiofur con la  $\beta$ -ciclodextrina. En el Capítulo 4, se presenta la caracterización electroquímica de ceftiofur en electrodos de pasta de carbono, el mecanismo de electrooxidación de la molécula que hasta el momento no ha sido reportado, así como la determinación de diversos parámetros termodinámicos y cinéticos del sistema de estudio. Más adelante, en el Capítulo 5, se presenta la determinación electroquímica en solución del complejo de inclusión ceftiofur- $\beta$ -ciclodextrina, así como la caracterización electroquímica de ceftiofur empleando electrodos modificados con poli- $\beta$ -ciclodextrina y diversos electrolitos. Finalmente, en el Capítulo 6, se presenta la determinación de ceftiofur, su cuantificación y la validación del método electroquímico a través de lo dispuesto por la IUPAC, así como guías para la validación de métodos de alto rendimiento en normas mexicanas, abriendo la posibilidad del estudio de muestras reales para la eventual aplicación del método en campo.



### III ABSTRACT

Ceftiofur is a highly used antibiotic to treat cattle infections, which when dosed indiscriminately promotes the appearance of traces in products such as meat and milk. When the latter are ingested, they lead to the generation of multi-drug-resistant bacteria to drugs from the same family. To face this problem, few methods have been developed for ceftiofur quantification, however, they use expensive and toxic materials, or employ procedures lacking adequate theoretical support. Based on the above mentioned, in this work we develop a spectrophotometric and electrochemical study of ceftiofur in aqueous media, as well as its interaction with  $\beta$ -cyclodextrin, which has previously contributed to study several analytes.

In Chapter 1 of this document, a description is presented of the problems of which ceftiofur is the subject of study and the actions that international regulatory institutions have taken to face them; the reported works focus on the study of the molecule, and on a description of the advantages derived from the use of  $\beta$ -cyclodextrin in solution, as well as through formation of polymeric films on electrode surfaces. Chapters 2 and 3, deal with the characterization of the ceftiofur absorption spectra through UV-Vis spectrophotometry, the evaluation of the stability of the molecule as a function of time due to the effect of the experimental conditions, the determination of its acidity and inclusion complex constants, produced by deprotonation and the interaction with  $\beta$ -cyclodextrin, respectively. In Chapter 4, we present the electrochemical characterization of ceftiofur on carbon paste electrodes, the electro-oxidation mechanism of the molecule that has not yet been reported, as well as the determination of several thermodynamic and kinetic parameters of the system studied. Subsequently, in Chapter 5, the electrochemical determination of the ceftiofur- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex is shown, as well as the ceftiofur electrochemical characterization on poly- $\beta$ -cyclodextrin-modified electrodes and various support electrolytes. Finally, Chapter 6 aimed at the determination, quantification and validation of the electrochemical method developed by means of the IUPAC provisions, as well as guidelines for validation of high performance methods in Mexican standards, opening the possibility of studying real samples for an eventual application of the method in a field study.



## IV DEDICATORIA

A mi tía, Alma Rosa Reyes Rivera,  
quien ahora junto a mis abuelos, me mira desde el cielo...



## V AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma metropolitana, Unidad Azcapotzalco, por abrirme las puertas de la casa abierta al tiempo y permitirme continuar con mi preparación académica en nivel maestría.

A mis Directoras del proyecto de investigación: Dra. Silvia Corona Avendaño y Dafne Sarahia Guzmán Hernández, por haberme ayudado en su momento a plantar los pies firmemente sobre la tierra, avanzar perseverantemente atacando los problemas de manera crítica, así como inculcar en mi bases sólidas de autocrítica y una visión con mejor perspectiva.

A la Dra. María Teresa Ramírez Silva, quien además de brindarme su valioso apoyo en el ámbito académico me dio valiosas lecciones de vida que me impulsan a crecer como una persona más segura de sí, viendo a la vida como una lienzo en el que uno mismo decide si los infortunios se vuelven alegrías y aprendizaje positivo, dependiendo del pincel con que se hagan los trazos.

Al Dr. Manuel Eduardo Palomar Pardavé, por la gran ayuda a través de la maestría, no sólo durante los cursos, sino también en el proyecto de investigación, inculcándonos el desarrollo de la razón para “pensar fuera de la caja” y comprender con mayor profundidad el significado de tantas cosas.

Al Dr. Mario Romero Romo, por su valiosa ayuda en el refinamiento gramatical de este documento y por la motivación para expresar de manera más elegante los resultados presentados.

A los integrantes del Laboratorio Interdisciplinar de Electroquímica e Ingeniería de Materiales (LIEIM), por ser siempre un apoyo moral de tono inquebrantable, gracias a su amistad y apoyo los tiempos de ansiedad, tristeza y desanimo fueron pocos.



Agradecimientos especiales:

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología la beca otorgada (693797) para realizar los estudios en el programa posgrado de Maestría en Ciencias e Ingeniería de Materiales de la UAM Azcapotzalco.

Al personal responsable del LIEIM, por las facilidades otorgadas para la conducción de los experimentos de este proyecto de investigación.

Al Laboratorio de Química Analítica de la UAM Iztapalapa, así como sus integrantes, académicos y alumnos, por haberme otorgado las facilidades necesarias para llevar a cabo parte de la experimentación que finalmente se encuentra plasmada en este documento.



## VI ÍNDICE

<b>II RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>III ABSTRACT.....</b>	<b>4</b>
<b>IV DEDICATORIA.....</b>	<b>5</b>
<b>V AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>6</b>
<b>VI ÍNDICE .....</b>	<b>8</b>
<b>VII ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ECUACIONES .....</b>	<b>12</b>
<b>VIII NOTACIÓN Y ABREVIATURAS .....</b>	<b>19</b>
<b>Capítulo 1 Introducción.....</b>	<b>22</b>
<i>1.1. Antecedentes .....</i>	<i>27</i>
<b>IX JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>32</b>
<b>X HIPÓTESIS.....</b>	<b>33</b>
<b>XI OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<i>Objetivo general .....</i>	<i>33</i>
<i>Objetivos específicos .....</i>	<i>33</i>
<b>XII RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>Capítulo 2 Estudio espectrofotométrico de ceftiofur .....</b>	<b>34</b>
<i>2.1. Introducción.....</i>	<i>34</i>
<i>2.2. Metodología.....</i>	<i>34</i>
2.2.1. Reactivos .....	35
2.2.2. Equipamiento .....	35
<i>2.3. Resultados .....</i>	<i>35</i>
2.3.1. Caracterización de las bandas de absorción de CF .....	36
2.3.2. Comportamiento de ceftiofur en distintos solventes acuosos .....	39
2.3.3. Comportamiento de CF en función del tiempo .....	40
2.3.4. Añejamiento de las soluciones de ceftiofur.....	45





<b>2.4. Conclusiones .....</b>	<b>46</b>
<b>3.5. Introducción.....</b>	<b>47</b>
<b>3.6. Metodología.....</b>	<b>48</b>
3.6.1. Comportamiento espectral de soluciones de CF en función del pH .....	48
3.6.2. Determinación del complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD.....	48
3.6.3. Reactivos .....	48
3.6.4. Equipamiento .....	49
<b>3.7. Resultados .....</b>	<b>49</b>
3.7.1. Comportamiento espectral de CF en función del pH .....	49
3.7.2. Cálculo de las constantes de acidez de CF .....	50
3.7.3. Cálculo de la constante de inclusión del complejo supramolecular CF- $\beta$ -CD...	60
<b>3.8. Conclusiones .....</b>	<b>64</b>
<b>Capítulo 4 Caracterización electroquímica de CF en EPC.....</b>	<b>66</b>
<b>4.1. Introducción.....</b>	<b>66</b>
<b>4.2. Metodología.....</b>	<b>66</b>
4.2.1. Fabricación del EPC.....	66
4.2.2. Montaje de la celda electroquímica.....	67
4.2.3. Reactivos .....	67
4.2.4. Equipamiento .....	67
4.2.5. Métodos electroquímicos .....	67
<b>4.3. Resultados .....</b>	<b>68</b>
4.3.1. Señal electroquímica característica de CF .....	68
4.3.2. El proceso de electrooxidación de CF en EPC.....	69
4.3.3. Determinación de parámetros electroquímicos de CF .....	80
<b>4.4. Conclusiones .....</b>	<b>83</b>
<b>Capítulo 5 Interacción electroquímica de CF y la <math>\beta</math>-CD .....</b>	<b>85</b>
<b>5.1. Introducción.....</b>	<b>85</b>
<b>5.2. Metodología.....</b>	<b>85</b>
5.2.1. Fabricación del EPC .....	¡Error! Marcador no definido.



5.2.2.	Montaje de las celdas electroquímicas .....	86
5.2.3.	Reactivos .....	86
5.2.4.	Equipamiento .....	86
5.2.5.	Determinación del complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD.....	86
5.2.6.	Electrooxidación de CF en empleando un EPC- $\beta$ -CD .....	87
<b>5.3.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>87</b>
5.3.1.	Complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD en medio acuoso empleando EPC.....	87
5.3.2.	Electropolimerización de la $\beta$ -CD sobre EPC para la obtención del EPC- $\beta$ -CD89	
5.3.3.	Naturaleza de la transferencia másica de CF en EPC- $\beta$ -CD .....	90
5.3.4.	Efecto de la modificación del EPC en diferentes solventes .....	92
<b>5.4.</b>	<b>Conclusión .....</b>	<b>94</b>
<b>Capítulo 6 Cuantificación de CF en EPC y EPC-<math>\beta</math>-CD.....</b>		<b>96</b>
<b>6.1.</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>96</b>
<b>6.2.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>96</b>
6.2.5.	Construcción del EPC y el EPC- $\beta$ -CD .....	96
6.2.6.	Montaje de las celdas electroquímicas .....	97
6.2.7.	Determinación de CF en EPC y EPC- $\beta$ -CD.....	97
6.2.8.	Validación del método electroquímico por EPC- $\beta$ -CD.....	97
6.2.9.	Reactivos .....	98
6.2.10.	Equipamiento .....	98
<b>6.3.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>98</b>
6.3.1.	Determinación de CF en EPC .....	98
6.3.2.	Determinación de CF en EPC- $\beta$ -CD y tres electrolitos soporte distintos por VC ¡Error! Marcador no definido.	
6.3.3.	Determinación de CF en EPC- $\beta$ -CD y tres electrolitos soporte distintos por VDP 104	
6.3.4.	Validación del método para la determinación de C .....	107
<b>6.4.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>113</b>
<b>XIV CONCLUSIONES GENERALES.....</b>		<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>XV REFERENCIAS .....</b>		<b>114</b>



<b>XVI Anexo A: espectrofotometría UV-Vis y SQUAD .....</b>	<b>124</b>
<b>XVII Anexo B: Técnicas electroquímicas .....</b>	<b>127</b>



## VII ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ECUACIONES

### Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Estructura química del ceftiofur <sup>[16]</sup> .....	23
<b>Figura 1.2.</b> Estructura química de la $\beta$ -CD <sup>[30]</sup> .....	26
<b>Figura 2.1.</b> Espectro de absorción característico de una solución 24.44 $\mu$ M CF a pH 1.1, en buffer de fosfatos 0.2 M.....	36
<b>Figura 2.2</b> Estructura general del grupo 7-ACA presente en las cefalosporinas <sup>[1]</sup> .....	37
<b>Figura 2.3</b> Estructura general del cromóforo 3-Cefem sulfurado de las cefalosporinas <sup>[5]</sup> .....	37
<b>Figura 2.4</b> Grupos funcionales de ceftiofur, a) tioéster, b) 7-ACA y c) iminometoxi, identificados en un espectro de absorción de CF a concentración 24.44 $\mu$ M en buffer de fosfatos y pH 6.....	39
<b>Figura 2.5.</b> Espectros de absorción característicos de CF a una concentración 24.44 $\mu$ M en distintos solventes a una concentración 0.2 M: HCl (—), H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (—) y buffer de fosfatos (—).....	40
<b>Figura 2.6.</b> Familias de espectros de absorción de CF obtenidos del estudio de CF en función del tiempo en presencia de luz y sin burbujeo continuo de N <sub>2</sub> , para soluciones de CF a una concentración 24.44 $\mu$ M CF, en buffer de fosfatos a pH a) 1.1, b) 6 y c) 10 (—, A <sub>t=0</sub> ) y (—, A <sub>t=120</sub> ). .....	42
<b>Figura 2.7.</b> Familias de espectros de absorción obtenidos del estudio en función del tiempo en ausencia de luz y con burbujeo constante de gas N <sub>2</sub> , para soluciones de CF a una concentración 24.44 $\mu$ M, en buffer de fosfatos a pH a) 1.1, b) 6 y c) 10 (—, A <sub>t=0</sub> ) y (—, A <sub>t=120</sub> ). .....	43
<b>Figura 2.8.</b> Familias de espectros de absorción obtenidos del estudio en función del tiempo, en ausencia de luz, para soluciones de CF a una concentración 24.44 $\mu$ M, en buffer de fosfatos a pH a) 1.1, b) 6 y c) 10 (—, A <sub>t=0</sub> ) y (—, A <sub>t=120</sub> ). .....	44
<b>Figura 2.9.</b> Espectros de absorción característicos de CF en soluciones añejadas por un periodo de un mes, a una concentración 24.44 $\mu$ M CF en buffer de fosfatos a pH 1.1 (—), 6 (—) y 10 (—). .....	45
<b>Figura 3.1.</b> Espectros de absorción obtenidos del estudio espectrofotométrico de CF en función del pH, a una concentración 24.44 $\mu$ M, en buffer de fosfatos 0.2 M y en un rango de pH de 1.1 a 12.....	50



<b>Figura 3.2.</b> Coeficientes de absortividad molar de las cuatro especies encontradas que CF es capaz de formar en el intervalo de pH de estudio, las barras de error respectivas se encuentran indicadas en el gráfico. ....	52
<b>Figura 3.3.</b> Diagrama de distribución de las especies químicas de CF. ....	53
<b>Figura 3.4.</b> Diagrama propuesto para la desprotonación sucesiva de los protones ácidos de la molécula de CF. ....	54
<b>Figura 3.5.</b> Comparación realizada de los espectros de absorción teóricos (O) y experimentales (—) para una concentración de CF en solución 24.44 $\mu\text{M}$ , a diferentes valores pH: a) 2.00, b) 4.01, c) 5.99 y d) 8.99. ....	54
<b>Figura 3.6.</b> a) Familia de espectros de absorción obtenidos del análisis puntual en una solución 24.44 $\mu\text{M}$ CF, en HCl con fuerza iónica 0.2 M y diferentes pH en un intervalo de 1.15 a 12.02. ....	56
<b>Figura 3.7.</b> a) Coeficientes de absortividad molar (con las barras de error respectivas) de las cuatro especies químicas de CF obtenidas mediante SQUAD a una concentración 24.44 $\mu\text{M}$ , b) Diagrama de distribución de especies de CF, calculado a partir de los $\text{pK}_a$ de CF obtenidos mediante SQUAD por medio del análisis puntual: $\text{H}_3\text{CF}$ (—), $\text{H}_2\text{CF}^-$ (—), $\text{HCF}^{2-}$ (—) y $\text{CF}^{3-}$ (—). ....	58
<b>Figura 3.8.</b> Comparación realizada de los espectros de absorción teóricos (O) y experimentales (—) para una concentración de CF en solución 24.44 $\mu\text{M}$ , a diferentes pH: a) 1.80, b) 2.81, c) 6.60 y d) 11.38. ....	60
<b>Figura 3.9.</b> a) Familia de espectros de absorción obtenidos del estudio de complejación de CF a una concentración 20 $\mu\text{M}$ , en una solución de HCl 0.2 M (pH 0.8), en función de la concentración de $\beta\text{-CD}$ , para un intervalo de $2.47 \times 10^{-5}$ a $3.71 \times 10^{-3}$ M. b) Acercamiento del espectro de absorción en la zona del punto isosbético I. El inserto de la figura muestra la absorbancia de la solución en función del $\text{p}\beta\text{-CD}$ evaluados para valores de $\lambda$ de 216 y 224 nm. ....	61
<b>Figura 3.10.</b> a) Coeficientes de absortividad molar de la especie $\text{H}_3\text{CF}$ (O) y $\text{H}_3\text{CF-}\beta\text{-CD}$ (O). b) Diagrama de distribución de especies químicas en función del $\text{p}\beta\text{-CD}$ . ....	62
<b>Figura 3.11.</b> Comparación de los espectros de absorción obtenidos por emulación (O) y los obtenidos experimentalmente (—) a dos diferentes valores concentración de $\beta\text{-CD}$ : a) $1.48 \times 10^{-3}$ y b) $4.94 \times 10^{-5}$ M. ....	64
<b>Figura 4.1</b> Voltamperogramas cíclicos obtenidos a una $v$ de $20 \text{ mV s}^{-1}$ para el sistema EPC/ HCl 0.2 M (pH 0.8), (—), y con 24.44 $\mu\text{M}$ CF (—). ....	68



<b>Figura 4.2.</b> a) Voltamperogramas cíclicos de CF a diferentes $v$ del sistema .....	70
<b>Figura 4.3</b> Comparación de las zonas anódicas en voltamperogramas teóricos (O) y experimentales (—), obtenidos del sistema EPC/CF 24.44 $\mu$ M, HCl 0.2 M (pH 0.58) .....	73
<b>Figura 4.4.</b> Voltamperogramas diferenciales de pulso del sistema EPC/CF (24.44 $\mu$ M), HCl (0.2 M), pH (0.8), obtenidos en un intervalo de amplitudes de pulso de 5 a 40 mV .....	74
<b>Figura 4.5.</b> Mecanismo electroquímico-químico (EC) de electrooxidación propuesto para CF. .	76
<b>Figura 4.6.</b> a) Voltamperogramas de disco rotatorio obtenidos para un intervalo de $\omega$ de 50 a 200 rpm. b) tendencia lineal definida por $i_{l,dif} = f(\omega^{1/2})$ , evaluada en un $E$ de 1071 mV. ....	78
<b>Figura 4.7.</b> a) Transitorios potenciostáticos del sistema EPC/CF 24.44 $\mu$ M, HCl 0.2 M (pH 0.58) en un intervalo de 800 a 1100 mV, así como un periodo de 0.6 s. El inserto de la figura muestra una curva $i = f(t^{-0.5})$ b) curva de $i$ en función del potencial aplicado a 200 (O), 300 (O), 400 (O) y 600 (O) ms. ....	80
<b>Figura 4.8.</b> a) Ejemplificación del gráfico de Koutecký-Levich generado a partir de los VDR del sistema EPC/CF 24.44 $\mu$ M, HCl 0.2 M (pH 0.8), empleando lo dispuesto en la Ecuación 6 <sup>[65]</sup> , para dos potenciales: $E_1 = 1000$ y $E_2 = 1020$ mV. b) curva <i>tipo Tafel</i> generada a partir de las corrientes $i_{Ki} = f(E_i)$ . ....	81
<b>Figura 5.1.</b> a) Familia de VC obtenidos del estudio de complejación en el sistema EPC/CF 24.44 $\mu$ M, HCl 0.2 M (pH 0.8), $x$ $\beta$ -CD ( $\{x \in \mathbf{R} \mid 24.44 \mu\text{M} \leq x \leq 2.444 \text{ mM} \}$ ). b) Gráfico de la $i_{pa} = f([CF] \cdot [\beta\text{-CD}]^{-1})$ . ....	88
<b>Figura 5.2.</b> a) Ajuste de los VC obtenidos del estudio de complejación en el sistema EPC/CF 24.44 $\mu$ M, HCl 0.2 M, con respecto a lo dispuesto por en el modelo de Gao y col. <sup>[74]</sup> .....	89
<b>Figura 5.3.</b> a) Familia de VC (10 ciclos) realizados en el sistema EPC/7 mM $\beta$ -CD, 1 M HClO <sub>4</sub> (pH 0), a 100 mVs <sup>-1</sup> b) Carga generada en cada ciclo de la electropolimerización de la $\beta$ -CD en la rama anódica (●) y catódica (●). ....	90
<b>Figura 5.4.</b> Familia de VC (100 ciclos) realizados a 200 mVs <sup>-1</sup> en el sistema EPC- $\beta$ -CD/0.2 M HClO <sub>4</sub> (pH 0.88) b) VC obtenidos a partir de EPC (—) y EPC- $\beta$ -CD (—) para el electrolito soporte citado anteriormente. ....	91
<b>Figura 5.5.</b> a) Perfiles voltamperométricos obtenidos del sistema EPC- $\beta$ -CD/0.2 M HClO <sub>4</sub> , a una $v$ de 100 mVs <sup>-1</sup> , para CF a una concentración 3.51 $\mu$ M (—), y el electrolito soporte (—). b) Familia	



de VC del sistema EPC- $\beta$ -CD/3.51 $\mu$ M CF, 0.2 M HClO <sub>4</sub> , a diferentes $v$ en un intervalo de 20 a 300 mV. En el inserto se muestra la tendencia lineal obtenida al graficar $i_{pa} = f(v)$ .....	92
<b>Figura 5.6.</b> Perfiles voltamperométricos obtenidos del electrolito soporte en el sistema EPC- $\beta$ -CD/ a) 0.2 M HCl (—), b) 0.2 M HClO <sub>4</sub> (—) y c) 0.2 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (—) (pH 0.88), a una $v$ de 100 mVs <sup>-1</sup> .....	93
<b>Figura 5.7.</b> Familias de VC obtenidos de los sistemas EPC- $\beta$ -CD/ 3.51 $\mu$ M CF, 0.2 M a) HCl, b) HClO <sub>4</sub> y c) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , en una ventana de potencial de 500 a 1100 mV, así como un intervalo de $v$ de 20 a 300 mV·s <sup>-1</sup> . El inserto de cada gráfico presenta los ajustes de $i_{pa} = f(v)$ obtenidos. ....	94
<b>Figura 6.1.</b> a) Familia de VC de CF a 100 mVs <sup>-1</sup> . b) Familia de VDP a $\Delta E$ de 20 mV, ambas técnicas utilizadas en el sistema EPC/CF (0.871-36.724 $\mu$ M), HCl (0.2 M) pH (0.8).....	99
<b>Figura 6.2.</b> Tendencia lineal de $i_{pa}$ en función de la concentración de CF, en el sistema EPC/CF (0.871-36.724 $\mu$ M), HCl (0.2 M), pH (0.8) obtenida por a) VC y b) VDP.....	99
<b>Figura 6.3.</b> Comparación de la zona anódica de CF, obtenida a partir de VC para los sistemas EPC- $\beta$ -CD/3.51 $\mu$ M CF, 0.2 M HCl (—), 0.2 M HClO <sub>4</sub> (—) y 0.2 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (—), comparados con el VC de CF en el sistema EPC/3.51 $\mu$ M CF, 0.2 M HCl (- - -). ....	101
<b>Figura 6.4.</b> VC obtenidas a partir de los experimentos de concentración variable de CF en los sistemas EPC- $\beta$ -CD/ $x$ $\mu$ M CF, a) 0.2 M HCl, b) 0.2 M HClO <sub>4</sub> y c) 0.2 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , donde $x$ es una concentración variable de CF en un intervalo de 0.354 a 13.64 $\mu$ M; en una ventana de potencial de 50 a 1100 mV y una $v$ de 100 mVs <sup>-1</sup> . El inserto presentado en cada gráfico muestra la curva de calibrado respectiva ( $i_{pa} = f([CF])$ ). ....	102
<b>Figura 6.5.</b> Curvas de calibrado ( $i_{pa} = f([CF])$ ) obtenidas a partir de experimentos de variación de concentración de CF en los sistemas EPC- $\beta$ -CD/ $x$ $\mu$ M CF, a) 0.2 M HCl (●), b) 0.2 M HClO <sub>4</sub> (●) y c) 0.2 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (●), donde $x$ es una concentración variable de CF en un intervalo de 0.354 a 13.640 $\mu$ M ; en una ventana de potencial de 700 a 1100 mV y a una velocidad de barrido de 100 mV·s <sup>-1</sup> .....	103
<b>Figura 6.6.</b> Comparación de los VDP obtenidos de los sistemas: EPC- $\beta$ -CD/3.51 $\mu$ M CF, 0.2 M HCl (—), 0.2 M HClO <sub>4</sub> (—) y 0.2 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (—), con el obtenido del sistema EPC/3.51 $\mu$ M CF, 0.2 M HCl (- - -). ....	104
<b>Figura 6.7.</b> VDP obtenidos a partir de los estudios de concentración conducidos para CF en los sistemas EPC- $\beta$ -CD/ $x$ $\mu$ M CF en: 0.2 M HCl, 0.2 M HClO <sub>4</sub> y 0.2 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , donde $x$ es una	



concentración variable de CF en un intervalo de 1.061 a 26.269 $\mu\text{M}$ ; en una ventana de potencial de 700 a 1100 mV, así como una amplitud de pulso de 25 mV.....	105
<b>Figura 6.8.</b> Curvas de calibrado ( $i_{pa}=f([CF])$ ) obtenidas a partir de experimentos de concentración variable de CF en los sistemas EPC- $\beta$ -CD/ $x$ $\mu\text{M}$ CF, a) 0.2 M HCl (●), b) 0.2 M HClO <sub>4</sub> (●) y c) 0.2 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (●), donde $x$ es una concentración variable de CF en un intervalo de 1.061 a 26.269 $\mu\text{M}$ ; a una ventana de potencial de 700 a 1100 mV y una amplitud de pulso de 25 mV.....	106
<b>Figura 6.9.</b> Trompeta de Horwitz [82]. .....	110
<b>Figura B.1.</b> Onda triangular de la Voltamperometría Cíclica <sup>[84]</sup> .....	128
<b>Figura B.2.</b> Onda de potencial de la Voltamperometría Diferencial de Pulso <sup>[85]</sup> . .....	129
<b>Figura B.3.</b> Onda de potencial de la Cronoamperometría <sup>[86]</sup> . .....	130

## Índice de Tablas

<b>Tabla 2.1</b> . Resumen de las estimaciones de las $\lambda_{\text{max}}$ de CF para su espectro de absorción a través de las reglas. ....	38
<b>Tabla 2.2</b> . Porcentaje total de cambio en la absorbancia inicial ( $A_{t=0}$ ) y final ( $A_{t=120}$ ) de la banda ubicada en $\lambda_3$ (grupo funcional tioéster) para los diferentes valores de pH y diferentes condiciones experimentales.....	44
<b>Tabla 3.1</b> Comparativa de las constantes de acidez de CF, obtenidas mediante simulación con el programa ACD/Labs y experimentalmente, determinadas mediante SQUAD.....	51
<b>Tabla 3.2</b> Valores numéricos de los $\epsilon$ como su error asociado para cada una de las cuatro especies químicas de CF, determinadas para una concentración 24.44 $\mu\text{M}$ .....	52
<b>Tabla 3.3</b> Constantes de acidez obtenidas para CF, a través de la aproximación con ACD/Labs y de manera experimental a través del estudio espectrofotométrico de CF en función del pH de manera continua (varios solventes), indicando la $\sigma$ y $U^2$ obtenidos por medio del ajuste con SQUAD. ....	55





<b>Tabla 3.4</b> Constantes de acidez obtenidas para CF, a través de simulación con ACD/Labs y de manera experimental a través del estudio espectrofotométrico de CF en función del pH ( $\text{Cl}^-$ ) y puntual ( $\text{Cl}^*$ ), así como la $\sigma$ y $U^2$ obtenidas para cada uno por medio del ajuste con SQUAD. ...	57
<b>Tabla 3.5</b> Coeficientes de absortividad molar (con sus respectivas desviaciones) de las especies químicas de CF, calculados a una concentración 24.44 $\mu\text{M}$ por medio del análisis puntual. ....	58
<b>Tabla 3.6</b> Constante de equilibrio, producto de la inclusión de CF en la $\beta$ -CD, determinada mediante SQUAD. ....	62
<b>Tabla 3.7</b> Coeficientes de absortividad molar de las especies químicas de CF, calculados a una concentración 20 $\mu\text{M}$ por medio del análisis puntual. ....	62
<b>Tabla 4.1.</b> Valores determinados con incertidumbre para los cuatro parámetros del modelo de adsorción descrito por la Ecuación 3, así como $n$ (derivado del parámetro $P_4$ ), en un intervalo de $v$ de 20 a 300 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . ....	72
<b>Tabla 4.2</b> Diferencia de potencial a la altura media de pico anódico y el número de electrones transferidos por CF, obtenidos de las VDP realizadas a diferentes amplitudes de pulso. ....	74
<b>Tabla 4.3</b> Coeficientes de difusión reportados para diferentes cefalosporinas y en varios electrolitos soporte ....	82
<b>Tabla 6.1.</b> Parámetros analíticos obtenidos de las curvas de calibrado de CF. ....	100
<b>Tabla 6.2.</b> Comparación de los parámetros electroanalíticos de CF obtenidos por VC en tres distintos electrolitos soporte, utilizando EPC y EPC- $\beta$ -CD. ....	103
<b>Tabla 6.3.</b> Comparación de los parámetros electroanalíticos de CF obtenidos por VDP en tres distintos electrolitos soporte, utilizando un EPC- $\beta$ -CD y EPC. ....	107
<b>Tabla 6.4.</b> Tabla con los valores de calculados y críticos de $t$ , para cada uno de los niveles evaluados. ....	111
<b>Tabla A.1.</b> Máximos de absorción en el ultravioleta cercano para algunos bencenos monosustituídos, en disolución acuosa J. R. Dyer (Applications of absorption spectroscopy of organic compounds, p. 18, Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs. N. J. (1965). ....	125

## Índice de ecuaciones

<b>Ecuación 1</b> .....	69
-------------------------	----



<b>Ecuación 2</b> .....	69
<b>Ecuación 3</b> .....	71
<b>Ecuación 4</b> .....	73
<b>Ecuación 5</b> .....	76
<b>Ecuación 6</b> .....	77
<b>Ecuación 7</b> .....	78
<b>Ecuación 8</b> .....	81
<b>Ecuación 9</b> .....	82
<b>Ecuación 10</b> .....	88
<b>Ecuación 11</b> .....	110
<b>Ecuación 12</b> .....	110
<b>Ecuación 13</b> .....	111
<b>Ecuación 14</b> .....	111
<b>Ecuación 15</b> .....	112



## VIII NOTACIÓN Y ABREVIATURAS

$\alpha_a$	Coeficiente de transferencia anódico [u.a.]
$\alpha$ -CD	$\alpha$ -ciclodextrina
$\beta$ -CD	$\beta$ -ciclodextrina
$\gamma$ -CD	$\gamma$ -ciclodextrina
$\Gamma$	Exceso superficial [mol/cm <sup>2</sup> ]
$\Delta E$	Amplitud de potencial
$\sigma$	Desviación estándar
$\sigma_H$	Desviación estándar de Horwitz
$\nu$	Velocidad de barrido de potencial [V/s]
$\omega$	Velocidad de rotación [rad·s <sup>-1</sup> ]
A	Área de electrodo [cm <sup>2</sup> ]
AA	Ácido ascórbico
$b_{Ox}$	Energía de adsorción de la especie oxidada [u.a]
$b_{Red}$	Energía de adsorción de la especie reducida [u.a]
CA	Cronoamperometría
CF	Ceftiofur
D	Coeficiente de difusión [cm·s <sup>-1</sup> ]
DA	Dopamina
DDS	Dodecil sulfato
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
E	Potencial [V]
$E^0$	Potencial formal [V]



EC	Electroforesis capilar
$E_{in}$	Potencial de inicio de barrido voltamperométrico [V]
EU	<i>European Union</i>
EPC	Electrodo de pasta de carbono
EPC- $\beta$ -CD	Electrodo de pasta de carbono modificado con poli- $\beta$ -CD
Epsilon EC	Software para la adquisición de datos del potenciostato Epsilon BASi
F	Constante de Faraday (96485 [C·mol <sup>-1</sup> ])
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HorRat	Relación de Horwitz
HPLC	<i>High Resolution Liquid Chromatography</i>
$i_o$	Corriente de transferencia [A]
$i$	Corriente [A]
$i_K$	Corriente en ausencia de efectos por transferencia másica [A]
$i_{l,dif}$	Corriente límite de difusión [A]
$i_{pa}$	Corriente de pico anódico [A]
$k^0$	Constante de velocidad heterogénea de transferencia de carga [cm·s <sup>-1</sup> ]
$n$	Número de electrons transferidos en una reacción faradaica
n	Número de experimentos efectuados para prueba $t$ y $F$
OCP	Potencial de circuito abierto
pH	$-\log[H^+]$
$pK_{ai}$	$-\log[K_{eqi}]$ ; $K_{eqi}$ constante de equilibrio de disociación [u.a.]
$pK_i$	$-\log[K_{li}]$ ; $K_{li}$ : constante de equilibrio químico de inclusión [u.a.]
ppm	Partes por millón [mM/L]
ppb	Partes por billón [ $\mu$ M/L]



R	Constante de los gases ideales $8.314 \text{ J} \cdot (\text{K} \cdot \text{mol})^{-1}$
% R	Porcentaje de recobro (%)
RSD	Coefficiente de variación (%)
RSD <sub>H</sub>	Coefficiente de variación de Horwitz
SQUAD	<i>Stability Quotients from Absorbance Data</i>
T	Temperatura [°C]
Tenox	Tenoxicam
U	Unidad [U]
U <sup>2</sup>	Suma de cuadrados
UV	Ultravioleta
VDR	Convección forzada por disco rotatorio
Vis	Visible
VOC	Voltamperometría de onda cuadrada
VRA	Voltamperometría de redisolución anódica
VRC	Voltamperometría de redisolución catódica
vs.	<i>Versus</i>
W <sub>1/2</sub>	Potencial de medio pico [V]



# Capítulo 1

## Introducción

Debido la necesidad de mejorar la eficacia de medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades producidas por bacterias de segunda, tercera y cuarta generación, se han desarrollado nuevos y más avanzados fármacos que poseen la capacidad para actuar frente a una amplia gama de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas <sup>[1]</sup>, no obstante, debido a su gran producción, efluentes industriales y productos alimenticios con contenido de éstos se han vuelto un serio problema que es relativamente ignorado por los sectores que los producen y utilizan <sup>[2]</sup>.

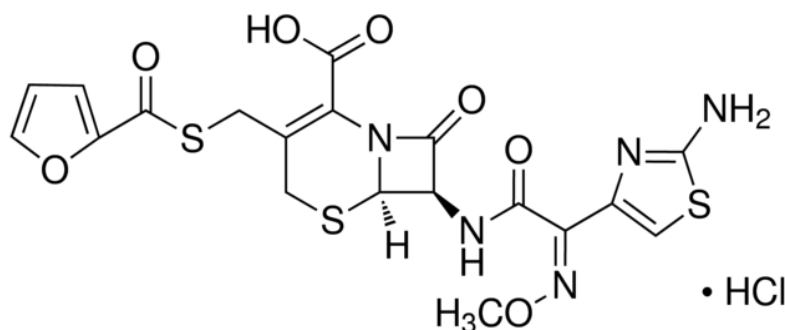
Una consecuencia de la expansión de la industria ganadera en gran escala es la decreciente preocupación por la salud de los animales de granja, ya que al tener una mayor cantidad de ganado, también es requerido un mayor número de personal para su cuidado, así como mejores formas de tratamiento y prevención de sus enfermedades que muchas veces no se satisface <sup>[2]</sup>. Para contrarrestar este descuido en la salud animal, se ha implementado una cultura de prevención de enfermedades mediante la dosificación indiscriminada de antibióticos en polvo o inyectados a éstos sin que estén enfermos, o dosificándolos en grandes cantidades cuando ya han contraído infecciones. Estos medicamentos, al no ser metabolizados en su totalidad, provocan que la carne o lácteos que finalmente llegan a los platos de miles de familias contengan sus residuos, afectando con ello de manera eventual la salud de las personas, ya que las bacterias del cuerpo que están en constante contacto con éstos se vuelven resistentes, haciendo que medicamentos de composición similar destinados para consumo en humanos tengan un menor efecto bactericida <sup>[2]-[4]</sup>; un caso particular de este fenómeno se encuentra en los fármacos de la familia de las cefalosporinas.

Las cefalosporinas, son un conjunto de fármacos que pertenecen a un grupo de antibióticos con grupo medular  $\beta$ -lactama, y han sido utilizadas para el tratamiento de varios tipos de infecciones desde el año de 1954 <sup>[5]</sup>. Se caracterizan por ser compuestos con actividad antimicrobiana de amplio espectro y baja toxicidad, cuyo mecanismo de acción involucra la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana. Estas moléculas, son biológicamente activas contra *Actinobacillus*



*pleuropneumoniae*, *Escherichea coli*, *Haemophilus parasius*, *Haemophilus somnus*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus sius* y *equi zooepidemicus*, entre otras <sup>[6]–[10]</sup>, su actividad de amplio espectro es atribuible en parte a su resistencia frente a la inactivación del grupo  $\beta$ -lactama, esencial para el propósito bactericida, sin embargo, es vulnerable ante la degradación por vía térmica, oxidativa, hidrólisis y fotólisis, siendo algunos de estos productos de degradación carentes de actividad antimicrobiana y potenciales desencadenantes de alergias en organismos de personas sensibles <sup>[6], [8]</sup>.

Ceftiofur, CF, (Figura 1.1) es una cefalosporina de tercera generación utilizada en medicina veterinaria aprobada por la *Food and Drug Administration*, FDA, y la Unión Europea, UE, para inyección intramuscular en el tratamiento de ciertas infecciones respiratorias y urinarias, cojera por traumatismo, metritis, y es aplicada en becerros, vacas, gallinas y puercos, así como también en caballos y otros rumiantes <sup>[8], [11]</sup>. Las ventajas derivadas de su uso, han permitido que su utilización se lleve a cabo de manera indiscriminada, provocando que muchos de los productos destinados para consumo humano provenientes de estos animales contengan trazas del fármaco o de alguno de sus productos de degradación <sup>[12]</sup>. Debido a esto, se han comenzado a investigar metodologías que permitan su cuantificación de manera eficiente, en términos de tiempo y costos, ya que el límite máximo permisible de este fármaco en los alimentos (establecido por instituciones internacionales como la FDA y UE) es de  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  <sup>[13]–[15]</sup>, concentración que sólo es posible determinar a través del uso de técnicas analíticas avanzadas.



**Figura 1.1.** Estructura química del ceftiofur <sup>[16]</sup>.



En la actualidad, la mayor parte de las investigaciones realizadas para la cuantificación de CF se llevan a cabo por medio del uso de técnicas de alto rendimiento como la electroforesis capilar y la cromatografía líquida de alto rendimiento, HPLC <sup>[16]</sup>, no obstante, la utilización de métodos que se encuentran basados en técnicas del tipo electroquímico (como las voltamperométricas), comienzan a tener relevancia frente a éstas, debido a que son técnicas de rápida respuesta, fácil utilización, más económicas y con alta sensibilidad, además de que la cantidad de residuos generados es sustancialmente menor <sup>[11]</sup>. Dentro de este último grupo de técnicas, a pesar de que se ha logrado efectuar la cuantificación de CF por tres métodos distintos (discutidos más adelante), las condiciones experimentales utilizadas no se encuentran debidamente justificadas, ya que no es claro cómo es afectada la molécula por los fenómenos de oxidación química y electroquímica que se reportan, al omitir en la discusión la posible ruta de fragmentación y el mecanismo de óxido-reducción que ésta experimenta, además, tampoco se detalla información acerca de la estabilidad química del fármaco en el solvente utilizado (buffer Britton-Robinson), debida particularmente a factores como la luz y el oxígeno disuelto en el solvente que pudiesen inclusive promover la descomposición de la molécula, y finalmente, la selección del pH de trabajo, ya que no se reportan las constantes de acidez,  $pK_a$ , utilizadas. Con respecto a esto último, otros autores han determinado valores de  $pK_a$  mediante simulación a través de programas computacionales, encontrando hasta 2 valores distintos, no obstante, parece obviarse el hecho de que al inspeccionar la molécula de CF (Figura 1.1) se observa la presencia de al menos tres grupos ácidos susceptibles a la desprotonación (grupos  $OH^-$  y aminas), que corresponden a un número mayor de valores de  $pK_a$  y por ende a un mayor número de especies químicas que pueden predominar en solución dentro del intervalo de pH, por lo que no es claro cuál es el comportamiento real que puede tener CF en solución y qué tipo de interacción existe con sus iones.

Dentro de la amplia gama de técnicas electroquímicas existentes, la innovación y la selección de materiales destinados al desarrollo de sensores electroquímicos es de gran relevancia, pues de éstos depende la sensibilidad y selectividad para la detección o determinación del o los analitos. Estos materiales, están compuestos principalmente por una parte receptora (encargada de realizar las transformaciones electroquímicas) conectada a una transductora (encargada de transformar la información recibida por la última en una señal física medible e interpretable) <sup>[17]</sup>, que al ser

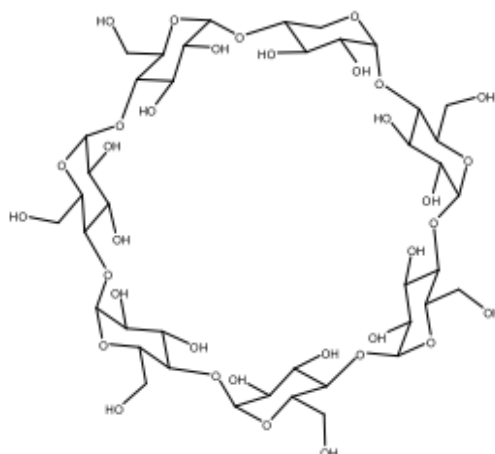




utilizados en conjunto como parte de un sistema electroquímico son definidos como electrodos <sup>[18]</sup>. Estos dispositivos cuentan hasta el momento con un importante progreso en términos de electroactividad, tamaño y bajo costo <sup>[17], [18]</sup>, especialmente si éstos son producidos en masa (electrodos desechables). La clasificación de estos electrodos está dada por el tipo de técnica asociada a su aplicación, dentro de las que se encuentran las voltamperométricas, amperométricas y potenciométricas <sup>[18], [19]</sup>, y dado que éstas pueden ser empleadas en el campo clínico, industrial, ambiental, entre otros, su aplicación en años recientes ha ido en aumento <sup>[17], [20]</sup>.

Actualmente, con el propósito de incrementar la sensibilidad o selectividad de los electrodos, es posible modificar los elementos receptores para obtener respuestas mejoradas a las que poseen comúnmente. La selección de estos agentes, empleados en la modificación de sensores electroquímicos depende de la interacción que éstos pueden tener con el analito de interés. Un ejemplo de estos agentes son un conjunto de moléculas denominadas como ciclodextrinas, CD:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD, que son comúnmente empleadas en la industria farmacéutica, y cuyo uso se ha vuelto común para el desarrollo de sensores electroquímicos <sup>[21]–[24]</sup>, al aprovechar los fenómenos promovidos por sus estructuras moleculares con forma de “canasta trunca”, en cuyo interior existen fuerzas hidrófobas que son capaces de inducir la formación de complejos de inclusión con moléculas orgánicas e inorgánicas <sup>[21], [25]</sup>, permitiendo con ello la mejora de algunas propiedades de los principios activos o analitos de interés, como son la solubilidad y estabilidad química <sup>[26]</sup>. La  $\beta$ -CD (Figura 1.2) en particular, actúa como un agente complejante natural, que permite la incorporación de hormonas, vitaminas y otros compuestos orgánicos en su estructura debido a su afinidad apolar <sup>[26]–[28]</sup>. Su utilización en electroquímica es factible, debido a que se puede llevar a cabo la formación de películas poliméricas en la superficie de diversos electrodos por medio de su electropolimerización, formando el polímero conductor poli- $\beta$ -CD <sup>[27]</sup>. A partir de este polímero, es posible obtener señales con mejor o mayor reproducibilidad, comparada con otro tipo de recubrimientos del tipo inorgánico, y con la ventaja de que no involucra procesos químicos intermedios <sup>[11], [29]</sup>. En este sentido, dado que parte de la estructura de CF tiene carácter apolar, la formación de un complejo de inclusión entre éste y la  $\beta$ -CD es posible, y podría ser utilizado para mejorar la solubilidad y estabilidad química del fármaco en solución.





**Figura 1.2.** Estructura química de la  $\beta$ -CD <sup>[30]</sup>.

Es por ello que en este trabajo, se estudia en primera instancia la estabilidad de CF a través de su comportamiento espectral en medio acuoso, para posteriormente efectuar la determinación de sus valores de  $pK_a$ , los cuales no han sido reportados hasta el momento a través de métodos experimentales, para llevar a cabo posteriormente su caracterización electroquímica, la determinación de sus parámetros electroquímicos y su cuantificación en soluciones sintéticas utilizando electrodos de pasta de carbono, EPC, así como EPC modificados con poli- $\beta$ -CD, EPC- $\beta$ -CD, en vías del desarrollo de un sensor electroquímico de CF que pueda ser utilizado en muestras reales.



## 1.1. Antecedentes

Debido a sus propiedades antibacterianas, las cefalosporinas se han convertido en moléculas de gran relevancia para las ciencias de la salud, y particularmente en la industria ganadera CF se ha convertido en una cefalosporina de interés, no obstante, debido a la implicación que tiene su presencia en los alimentos derivados de ésta, se ha vuelto necesario el establecimiento de controles sanitarios más rigurosos. En particular, desde el año 2010 hasta la fecha se han reportado sólo tres trabajos electroquímicos encaminados a la determinación de CF, publicados por Marcos Jacques y col., quienes desarrollaron métodos voltamperométricos para su determinación en buffer Britton-Robinson como electrolito soporte, con un electrodo de trabajo de gota suspendida de mercurio, HDME. En el primero de estos trabajos, se efectuó la determinación de CF en muestras sintéticas y lácticas utilizando voltamperometría de onda cuadrada, VOC, concluyendo que el proceso de reducción de la molécula es aparentemente irreversible e involucra la pérdida de protones de su estructura, obteniendo además límites de detección y de cuantificación de 1.86 y 6.20 ng·mL<sup>-1</sup>, respectivamente <sup>[31]</sup>. En el segundo, los parámetros electroanalíticos fueron mejorados al utilizar voltamperometría de redisolución catódica, VRC, como técnica para su determinación en suero bovino, obteniendo límites de detección y cuantificación de 0.31 y 1.05 ng·mL<sup>-1</sup>, respectivamente <sup>[32]</sup>, en donde además se presenta el efecto en la respuesta electroquímica de CF debido a cambios en el pH, tiempo de acumulación, concentración del fármaco, así como velocidad de barrido de potencial, sin llevar a cabo el cálculo de parámetros electroquímicos <sup>[32]</sup>, y finalmente, en el tercero de ellos se llevó a cabo un estudio por medio de la utilización de la VOC para la determinación indirecta de CF en muestras lácticas a través un producto de hidrólisis, mediante el cual obtuvieron límites de detección y cuantificación de 0.19 y 0.65 ng·mL<sup>-1</sup>, respectivamente <sup>[33]</sup>. Todos los métodos anteriormente expuestos, cuentan con la capacidad para realizar la cuantificación de CF dentro de los límites residuales máximos permisibles establecidos por la FDA y UE <sup>[13], [14]</sup>, sin embargo, de la información reportada, es posible advertir que aún existe un gran campo de estudio acerca de la molécula, ya que por ejemplo, no ha sido reportado hasta el momento su estabilidad química en tiempos cortos de análisis, el comportamiento que presenta la molécula ante cambios de pH, la determinación de sus constantes de acidez de manera experimental, la determinación de su mecanismo de electrooxidación y el número de electrones involucrados en ésta, así como la



identificación de los productos de su degradación, entre otros; cuyo conocimiento podría facilitar el diseño experimental de métodos destinados para su determinación. En este sentido, existen algunos trabajos que soportan dichos aspectos: Agnieszka Dolhán y col. reportan por medio del uso de HPLC la estabilidad de CF en función de su porcentaje de concentración residual <sup>[34]</sup>, por efecto del tiempo de almacenamiento bajo diversas condiciones ambientales y evaluando distintos solventes entre los que se encuentran: agua inyectable, solución de Ringer ( $9 \mu\text{g mL}^{-1}$  NaCl y  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  glucosa, 1:1 V/V y 1:2 V/V), cloruro de sodio ( $9 \mu\text{g mL}^{-1}$  NaCl), glucosa ( $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$ ), fluido isotónico multielectrolítico, entre otros. A partir de estas evaluaciones de estabilidad, bajo condiciones normales de temperatura y presión, STP, se encontró que en las dos primeras soluciones CF presenta la mejor estabilidad, al conservar alrededor del 92 % de la concentración inicial de las soluciones después de 23 días de almacenamiento, y por otro lado, los porcentajes de recuperación de las demás soluciones varían, siendo la solución de glucosa la de peor estabilidad, al obtener alrededor de 72 % de la concentración inicial al término del periodo de 23 días, y más aún, en varios de éstos solventes se detectó la aparición de un precipitado de color amarillo después de 6 días de almacenamiento. Otras fuentes, proporcionan información espectrofotométrica que soporta la existencia de un comportamiento distinto por parte de CF en función de los solventes utilizados, como así lo demuestra Krystyna Tyckzowska y col., a través de un espectro de absorción obtenido de un estándar de CF disuelto en una mezcla no acuosa que cuenta con tres bandas de absorción situadas en longitudes de onda máxima,  $\lambda_{\text{max}}$ , con valores de  $\lambda_1=291$ ,  $\lambda_2=263$  y  $\lambda_3=229 \text{ nm}$  <sup>[35]</sup>, distinto en forma al encontrado por Marcos Jacques y col., obtenido de una solución de CF disuelto en buffer Britton-Robinson a pH 10 y  $60^\circ\text{C}$  (de  $\lambda_1=290$ ,  $\lambda_2=257$  y  $\lambda_3=229 \text{ nm}$ ), en donde además se presume que bajo estas condiciones es posible obtener un producto de hidrólisis <sup>[33]</sup>. A pesar de que esta información no relaciona de manera directa la naturaleza de estas diferencias espectrales, proporciona un claro indicio de que es posible encontrar diferentes especies químicas de CF en función de las condiciones de trabajo utilizadas y que inclusive es posible obtener ciertos productos de degradación, que bien podrían tener relación con lo reportado por Thomas Koshy y col. <sup>[36]</sup>, quienes reportan hasta ocho productos de degradación distintos identificados por HPLC, dependiendo del medio y las condiciones experimentales empleadas.



En relación a las constantes de acidez de CF, Patricia Puig y col. reportan valores de 2.62 y 2.9 <sup>[37]</sup>, obtenidos a través de simulación por medio del programa computacional *Advanced Chemistry Development* (ACD/Labs), no obstante, debido a que dicho programa realiza el cálculo de las constantes con base en datos precargados de otras moléculas, no se toma en consideración las interacciones que el solvente pueda ejercer sobre el analito, y además no se identifica a qué protones ácidos pertenecen. Por otra lado, la *U.S. National Library of Medicine* ha reportado en la *Hazardous Substances Data Bank* una constante de acidez para CF con valor de 3.7 <sup>[6]</sup>, obtenida a partir de simulación por medio de la teoría de funcionales de la densidad, DFT, y asociada específicamente al protón ácido del ácido carboxílico del grupo 7-ACA. Estos valores reportados pueden no ajustarse a los valores de  $pK_a$  reales de CF, y por ende, los estudios efectuados que los toman en consideración pueden tener discrepancias entre sí, debido a las condiciones experimentales utilizadas y al predominio relativo de las especies químicas presentes en la solución, lo cual soportaría en principio la necesidad de su determinación por métodos experimentales, tomando en consideración, además, factores que pueden influir en la estabilidad química de la molécula.

Dentro del grupo de trabajo, se tiene como experiencia la determinación de valores de  $pK_a$  de moléculas orgánicas de manera experimental, así como por medio del uso de programas computacionales para el procesamiento de datos como *Stability Quotients from Absorbance Data*, SQUAD <sup>[38], [39]</sup>, obteniendo resultados comparables y en ocasiones más precisos que los obtenidos a partir de DFT <sup>[40]</sup>. Por otra parte, el desarrollo de métodos electroquímicos para la obtención de sensores, también es un campo ampliamente estudiado, siendo uno de los más estudiados el EPC <sup>[21], [26], [40]-[42]</sup>, constituido principalmente por una mezcla de grafito y aceite mineral, el cual es utilizado debido a sus diversas propiedades, entre las que se encuentran el contar con un tamaño de partícula homogéneo, baja capacidad adsorptiva de los analitos en su superficie, así como el hecho de que los componentes para su construcción no son costosos, son fácilmente asequibles y de alta pureza <sup>[19]</sup>. Por otro lado, sus aplicaciones son amplias, dado que pueden emplearse en diversos sistemas electrolíticos y a que es posible someterlo a modificaciones para obtener respuestas más selectivas por parte de los analitos. Ejemplos de este último aspecto es el estudio de neurotransmisores como la melatonina, la dopamina, DA, y el efecto que tiene en sus respuesta



electroquímica la interacción con surfactantes como el dodecil sulfato, DDS, así como bromuro de cetiltrimetilamonio, CTAB, en donde la presencia de estos provoca que los procesos de transferencia de masa en el electrodo cambien, llevándose a cabo por medio de un control adsorptivo en lugar de uno difusivo <sup>[41], [43]</sup>. Se ha estudiado además, la influencia de interferentes que de manera natural coexisten con estas moléculas, como lo es el ácido ascórbico, AA, cuya señal electroquímica en un EPC se traslapa con la de la DA <sup>[44]</sup> ; pero que sin embargo, al realizar la modificación de la superficie electródica con poli- $\beta$ -CD (o en otras palabras, utilizando un EPC- $\beta$ -CD), la respuesta electroquímica obtenida por ambas especies se ve modificada resultando en la resolución de las señales, permitiendo con ello efectuar determinaciones de estas especies por separado o de manera simultánea <sup>[45]</sup>, demostrando con ello que la modificación del electrodo, además de ser sencilla es eficiente.

En estudios más recientes, se llevó a cabo el estudio de un fármaco conocido como tenoxicam, Tenox, caracterizado espectro-electroquímicamente <sup>[46]</sup>, en donde se demuestra que Tenox cuenta con un mecanismo de desprotonación en dos etapas, así como un mecanismo de fragmentación por efecto de la electrooxidación en el EPC, corroborado por medio de la simulación teórica de la molécula y los fragmentos producidos por su electrooxidación, así como por determinaciones cromatográficas vía HPLC <sup>[40]</sup>. Por otra parte, haciendo uso de las ventajas que tienen las técnicas electroquímicas, se encontraron los potenciales de oxidación característicos de Tenox, parámetros electroquímicos como el coeficiente de difusión, exceso superficial, su radio molecular por medios experimentales y teóricos, obteniendo valores muy cercanos entre métodos <sup>[46]</sup> y finalmente, se determinó la constante de equilibrio termodinámico del complejo de inclusión Tenox- $\beta$ -CD, formada en la poli- $\beta$ -ciclodextrina sobre un EPC, así como la concentración máxima superficial de Tenox sobre la superficie del electrodo <sup>[47]</sup>.

Tras evidenciar la poca información que existe acerca de CF, y que a su vez esta presenta discrepancias, en este trabajo se propone estudiar por medio de espectrofotometría UV-Vis la estabilidad de CF y el efecto que tienen factores como la luz y el oxígeno disuelto en las soluciones de trabajo, la determinación de los valores de  $pK_a$  de CF de manera experimental a través del uso programa computacional SQUAD, así como el estudio de la interacción de CF con la  $\beta$ -CD para conocer si la formación del complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD es posible. Asimismo, a través del



empleo de diferentes técnicas electroquímicas, se propone el estudio del proceso redox de CF en EPC y EPC- $\beta$ -CD, la obtención de sus parámetros electroanalíticos para poder explicar de mejor manera la naturaleza de la molécula, llevar a cabo su determinación y finalmente efectuar su cuantificación para fijar con ello bases necesarias que permitan el eventual desarrollo de un sensor electroquímico que pueda ser utilizado de manera directa en campo.



## IX JUSTIFICACIÓN

La creciente utilización indiscriminada de antibióticos como ceftiofur en la industria ganadera y de lácteos, conlleva a que éste o algún subproducto de él no lleguen a ser metabolizados completamente por los animales a los que se dosifica, lo que provoca que trazas de él se encuentren presentes en los alimentos procedentes de esta industria. Al ser consumido alguno de estos productos contaminados, las bacterias en el cuerpo humano interactúan con estos residuos y generan resistencia a ellos, provocando una deficiencia posterior en la efectividad bactericida de fármacos de composición similar, destinados al tratamiento de infecciones en humanos, e inclusive generando en algunos casos alergias en personas sensibles. En este sentido, en un inicio y debido a que no ha sido reportados previamente en la literatura, es importante conocer el comportamiento químico de esta molécula en medio acuoso para así saber cuáles son las especies que pueden predominar en el pH, tanto ácido, neutro y básico, así como su estabilidad química en función del tiempo, ya que con esta información se pueden desarrollar nuevos métodos para su determinación, principalmente electroquímicos, que pueden ser utilizados directamente en la industria ganadera mexicana, y aunque existen tres trabajos electroquímicos para la cuantificación del fármaco, utilizan materiales tóxicos de difícil manejo, tampoco se explica el mecanismo redox de la molécula y productos de degradación durante la experimentación.





## X HIPÓTESIS

Mediante el uso de métodos espectrofotométricos, auxiliados por el programa computacional SQUAD, pueden calcularse valores más exactos de las constantes de acidez del CF en medio acuoso; la constante de inclusión, producto de su interacción con la  $\beta$ -CD; así como el mecanismo redox del CF y su determinación, por medio de un estudio electroquímico, en EPC y EPC modificados.

## XI OBJETIVOS

### Objetivo general

Cuantificar ceftiofur en un medio acuoso por métodos espectrofotométricos y electroquímicos, por medio de EPC y EPC modificados con poli- $\beta$ -CD.

### Objetivos específicos

- Estudiar la estabilidad química en el tiempo del CF en medio acuoso
- Calcular las constantes de acidez del CF por métodos espectrofotométricos y el programa computacional SQUAD.
- Calcular las constantes de inclusión del complejo supramolecular CF-  $\beta$ -CD por métodos espectrofotométricos y el programa computacional SQUAD.
- Estudiar el proceso redox del CF, empleando EPC como electrodo de trabajo.
- Calcular los parámetros analíticos, producto de la cuantificación de CF en EPC modificados con poli- $\beta$ -CD



## XII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

# Capítulo 2

## Estudio espectrofotométrico de ceftiofur

### 2.1. Introducción

**E**n la literatura, se he reportado que CF es una sustancia termosensible, fotosensible, así como poco soluble en agua <sup>[6], [48]</sup>, su estabilidad química ha sido evaluada de manera cualitativa y cuantitativa en periodos largos de análisis <sup>[34]</sup>, sin embargo, actualmente no existe información experimental acerca de su estabilidad en periodos cortos, a través de alguna propiedad física medible como la absorbancia en la espectrofotometría UV-Vis.

Para llevar a cabo el estudio de sustancias con las características de CF, es necesario controlar en la medida de lo posible las condiciones experimentales para asegurar que las variaciones observadas en los sistemas de estudio se deban únicamente a perturbaciones planeadas y no a perturbaciones inesperadas como la degradación por fotólisis, hidrólisis, entre otras. Es por ello, que este capítulo se centra en la evaluación del comportamiento de CF en periodos cortos de análisis, variando factores tales como la luz y el oxígeno disuelto; así como el efecto del tiempo de análisis y la utilización de distintos solventes, con el propósito de conocer cuáles son las condiciones que ofrecen la mejor estabilidad del fármaco en solución y evaluar si existe algún tipo de interacción entre éste y los iones en solución.

### 2.2. Metodología

El estudio de estabilidad química de CF por vía espectrofotométrica UV-Vis se lleva a cabo en soluciones de ácido clorhídrico, ácido perclórico y buffer de fosfatos con concentración 0.2 M, a tres diferentes valores de pH: 1.1, 6 y 10 y una concentración de CF  $24.44 \pm 0.02 \mu\text{M}$ . Los experimentos espectrofotométricos se conducen a través de la medición de la absorbancia de las soluciones descritas, cada 2 minutos, durante 120 minutos, en un intervalo de longitudes de onda



de 200 a 600 nm, en condiciones normales de temperatura y presión, STP, con y sin protección de factores como la luz y el oxígeno disuelto así como ácido carbónico.

### **2.2.1. Reactivos**

Las soluciones utilizadas son preparadas con clorhidrato de CF ( $24.44 \pm 0.02$ )  $\mu\text{M}$  (97.9 %), así como Buffer de fosfatos  $0.2 \pm 0.00$  M ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  (98 %),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (98 %) y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (98 %)),  $\text{HClO}_4$   $0.2 \pm 0.00$  M (70 %),  $\text{HCl}$   $0.2 \pm 0.00$  M (37 %), Metanol y  $\text{NaOH}$  (98 %), obtenidos de Sigma-Aldrich. Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada Tipo I ( $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) Milli-Q modelo Integral 5, previamente hervida, así como burbujeo de gas  $\text{N}_2$  para el desplazamiento oxígeno disuelto en las soluciones.

### **2.2.2. Equipamiento**

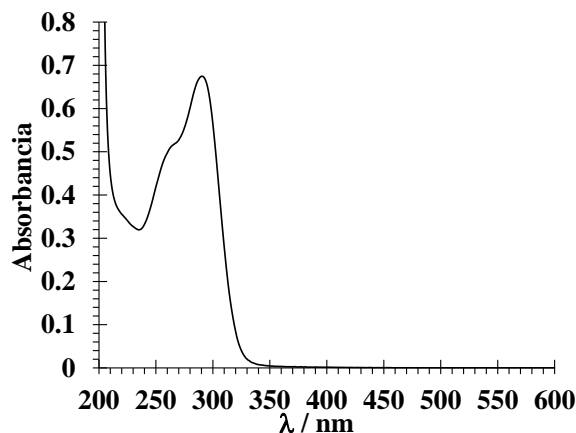
Los estudios espectrofotométricos se llevan a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 35, con el software Lambda 35 para el control y adquisición de datos, así como celdas de cuarzo con longitud de paso óptico de 1 cm. El sistema utilizado para la experimentación es una parrilla de agitación IKA, modelo C-MAG HS-7, conectada a un controlador de temperatura IKA, modelo ETS-D5 con el cual se controla la temperatura de la celda a 25 °C. Las mediciones de pH se llevan a cabo en un potenciómetro Mettler Toledo modelo SevenMulti, por medio de un electrodo combinado de vidrio (dentro de un intervalo de pH de 1 a 12 unidades).

## **2.3. Resultados**

En la Figura 2.1 se presenta un espectro de absorción característico de CF, en una solución buffer de fosfatos 0.2 M a pH 1.1, a una concentración 24.44  $\mu\text{M}$  CF, en un intervalo de 600 a 200 nm, no obstante, debido a que para en el intervalo de 600 a 341 nm no se presentan señales de absorción que representen información de utilidad para describir el comportamiento de CF, en análisis posteriores, los espectros de absorción el intervalo son acotados de 340 hasta 200 nm, intervalo dentro del cual el espectro de absorción contiene tres bandas de absorción, de derecha a izquierda, la primera de ellas es denominada como la “banda característica” de CF, con un máximo situado a



una longitud de onda máxima,  $\lambda_1$  de 291 nm, así como otras dos bandas que no se encuentran bien definidas, situadas en una  $\lambda_2$  de 266 y  $\lambda_3$  de 224 nm.



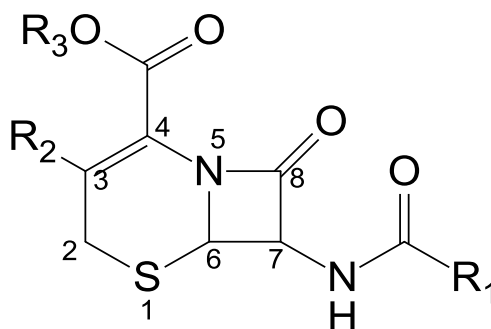
**Figura 2.1.** Espectro de absorción característico de una solución 24.44  $\mu$ M CF a pH 1.1, en buffer de fosfatos 0.2 M.

### 2.3.1. Caracterización de las bandas de absorción de CF

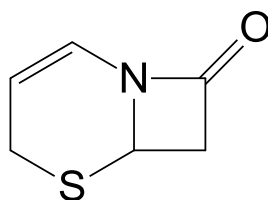
Para analizar esta banda se sabe, que las cefalosporinas son moléculas cuya estructura química se compone de un sistema aromático integrado por un grupo  $\beta$ -lactama- $\Delta^3$ -dihidrotiazina, denominado comúnmente como ácido 7-aminocefalosporánico o 7-ACA (Figura 2.2), al cual se encuentran anclados distintos tipos de sustituyentes en las posiciones C4 (R3), C3 (R2) y C7 (acilamido, R1), que a su vez dan lugar a la amplia gama de cefalosporinas que se conocen actualmente <sup>[1]</sup>. En particular para CF, los tres sustituyentes que se encuentran enlazados al grupo medular 7-ACA en las posiciones R3, R2 y R1, y por tanto definen su estructura, se han identificado como: un protón, un grupo tioéster y un grupo iminometoxi, respectivamente, y que serán referenciados más adelante a lo largo del texto. De la información espectroscópica disponible para CF, el cromóforo 3-Cefem (Figura 2.3) se encuentra comúnmente a una  $\lambda_{\text{max}}$  cercana a los 260 nm <sup>[5]</sup>, por lo que se espera encontrar una de sus bandas cercana en dicha posición o desplazada ligeramente. En el alcance de la revisión literaria efectuada, no se encuentra información adicional acerca de los grupos funcionales restantes de la molécula; sin embargo, es posible asociar estos grupos con las bandas de absorción del espectro UV-Vis de CF a través de las reglas empíricas



propuestas por J. R. Dyer <sup>[49]</sup>, las cuales, a pesar de que están indicadas para compuestos del tipo  $R-C_6H_4-COX$ , tienen la característica de dar mayor importancia a los grupos auxóchromos (que producen efectos batocrómicos o hipsocrómicos), y por ende pueden utilizarse para predecir los valores de  $\lambda_{max}$  de sus bandas de absorción.



**Figura 2.2** Estructura general del grupo 7-ACA presente en las cefalosporinas <sup>[1]</sup>.



**Figura 2.3** Estructura general del cromóforo 3-Cefem sulfurado de las cefalosporinas <sup>[5]</sup>.

Utilizando las reglas anteriormente mencionadas (las cuales pueden consultarse en el Anexo A de este documento), es posible se asignar valores aproximados de  $\lambda_{max}$  a las bandas de absorción de CF, ya que éstas se centran en la presencia de grupos auxóchromos y no en las transiciones electrónicas que pudiesen llevarse a cabo en su estructura. Para los fragmentos de CF, los valores de  $\lambda_{max}$  se asignan de la siguiente manera (ver resumen en Tabla 2.1): en el grupo tioéster, únicamente se encuentra un grupo “X” que es un O-alquilo, el cual otorga una  $\lambda$  base de 230 nm, y R, que es un grupo alquilo que desplaza la banda 3 nm, resultando en una  $\lambda_{max}$  de 233 nm; por otro lado, el grupo 7-ACA cuenta con un grupo cromóforo  $CO_2H$  que genera una  $\lambda$  base de 230 nm, y como grupo R, se encuentra un sustituyente O-alquilo en posición *para*, que desplaza 25 nm dicha banda, generado así una absorción máxima en 255 nm, y finalmente el grupo iminometoxi



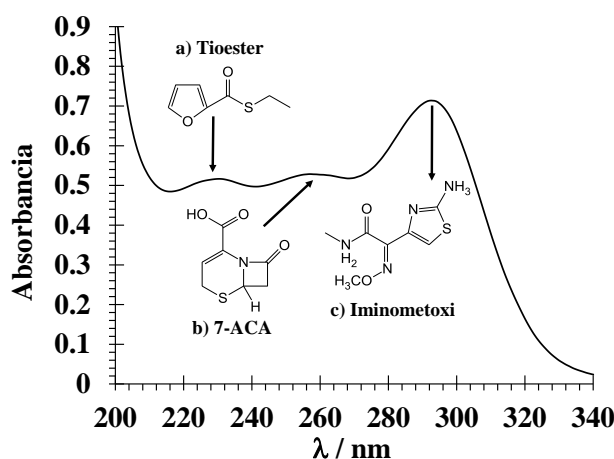
(el fragmento más polar de los 3), contiene un grupo “X” denominado como “resto de anillo”, que ubica la absorción en una  $\lambda$  base de 246 nm, y tiene además dos grupos en R, particularmente un grupo –OMe y un O-alquilo, que otorgan una  $\lambda$  de 25 nm cada uno, proporcionando un desplazamiento de 50 nm y que posicionan su  $\lambda_{\text{max}}$  en 296 nm, sin embargo, debido a las interacciones existentes entre estos grupos, el medio y entre propias moléculas de CF, es de esperar que las bandas de absorción se encuentren ligeramente desplazadas de estos valores, como se ha observado con previamente en el espectro de absorción de la Figura 2.1.

**Tabla 2.1** . Resumen de las estimaciones de las  $\lambda_{\text{max}}$  de CF para su espectro de absorción a través de las reglas.

Grupo funcional	$\lambda$ (cromóforo base) / nm	$\lambda$ (alquilo) / nm	$\lambda$ (O-alquilo) / nm	$\lambda$ (-OMe) / nm	$\lambda$ Total / nm
Tioéster	230	3			233
7-ACA	230		25		255
Iminometoxi	246		25	25	296

A partir de las aproximaciones conducidas por medio de las reglas empíricas de J. R. Dyer para la identificación de las bandas de absorción de CF, en la Figura 2.4 se presenta un espectro de absorción de CF experimental (a pH 6), en el cual se hallan indicados (en función de su  $\lambda_{\text{max}}$  teórica) los fragmentos estructurales de CF en función de sus posiciones teóricas, de la cual es posible advertir claramente la coincidencia entre pares, otorgando con ello fiabilidad a la aproximación conducida, que no ha sido reportada en la literatura.





**Figura 2.4** Grupos funcionales de ceftiofur, a) tioéster, b) 7-ACA y c) iminometoxi, identificados en un espectro de absorción de CF a concentración 24.44  $\mu\text{M}$  en buffer de fosfatos y pH 6.

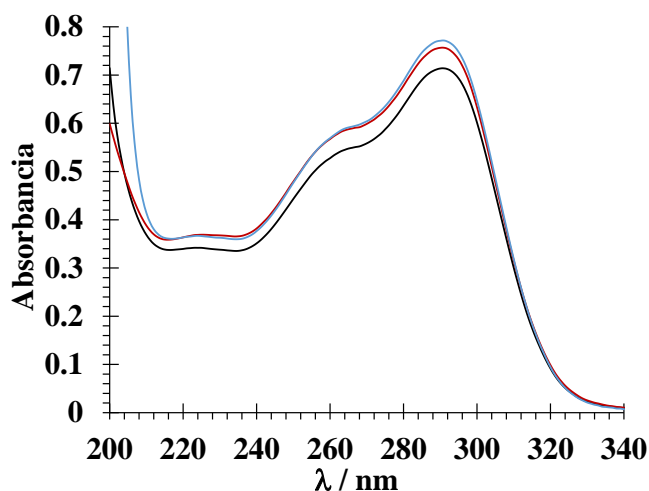
### 2.3.2. Comportamiento de ceftiofur en distintos solventes acuosos

La evaluación de distintos solventes para la disolución de analitos es una actividad de importancia, ya que se ha demostrado que, tanto la composición, como la fuerza iónica de éstos conllevan la promoción de distintos efectos en las propiedades de solubilidad, estabilidad química, así como las especies químicas del analito o analitos que están presentes en solución, modificando su comportamiento espectral. Como previamente se ha discutido, Krystyna Tyckzowska y col., así como Marcos Jacques y col. <sup>[33], [35]</sup>, reportaron independientemente espectros de absorción de CF, sin embargo, debido a la naturaleza de los solventes empleados y las condiciones experimentales utilizadas, no es posible realizar una comparación directa entre estos espectros de absorción y los obtenidos en este trabajo. Tomando en consideración estas evidencias experimentales que soportan la importancia de evaluar del comportamiento de CF en distintos solventes, en este trabajo se propone el uso de tres solventes: ácido clorhídrico, perclórico y una solución de buffer de fosfatos.

En la Figura 2.5, son presentados los espectros de absorción característicos de CF, obtenidos a partir de los tres solventes mencionados; de los que es claramente perceptible la similitud que presentan los espectros, tanto en forma, como en las bandas de absorción, situadas en los mismos valores de  $\lambda$ , sin embargo, debido a que el buffer de fosfatos es un solvente cuya composición



asemeja de mejor manera los fluidos corporales, y más aún, debido a el espectro obtenido mediante este solvente es el que presenta una menor absorción en la región del  $O_2$ , es el seleccionado como idóneo para el análisis y las determinaciones espectrofotométricas posteriores de este capítulo, no obstante, para fines de comparación, se hace referencia a determinaciones efectuadas a partir del empleo de los tres solventes.



**Figura 2.5.** Espectros de absorción característicos de CF a una concentración  $24.44 \mu M$  en distintos solventes a una concentración 0.2 M: HCl (—),  $H_3PO_4$  (—) y buffer de fosfatos (—).

### 2.3.3. Comportamiento de CF en función del tiempo

Con respecto a lo reportado en torno a la estabilidad de CF, los resultados obtenidos por Agnieszka Dolhán y col. <sup>[34]</sup>, advierten de manera cualitativa la degradación de la molécula por efecto del solvente utilizado en largos periodos almacenamiento, no obstante, debido a que no existen evaluaciones para periodos de tiempo cortos, dicha evaluación es conducida para conocer el comportamiento de CF bajo en distintas condiciones.

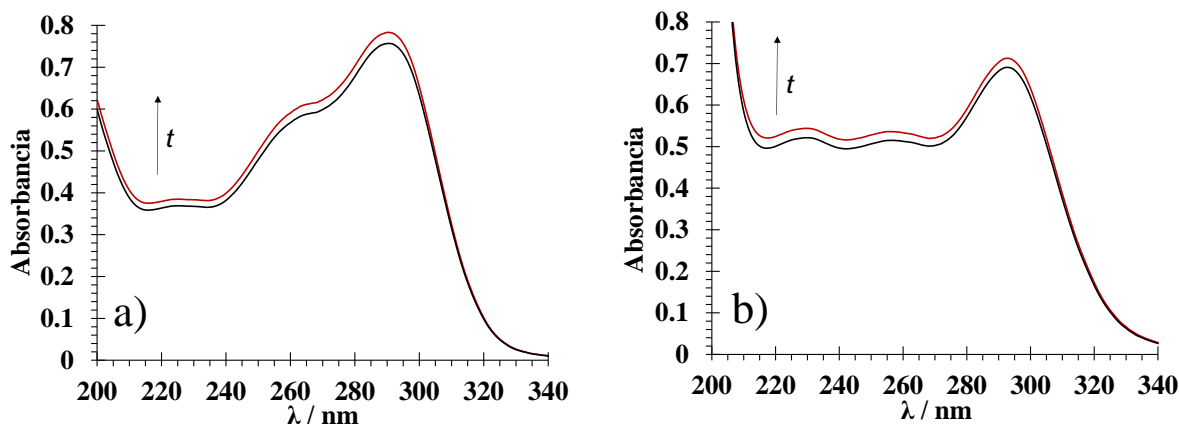
El estudio de estabilidad de CF en soluciones buffer de fosfatos a pH 1.1, 6 y 10, con el fin de evaluar las diferencias que existen entre los espectros de absorción y su comportamiento por efecto de la variación de diversos factores experimentales. Estos factores a considerar son: el efecto de la luz y en su ausencia por medio de la utilización de una barrera física, y por otro lado, el efecto del oxígeno disuelto en las soluciones, por medio de burbujeo constante de  $N_2$ .

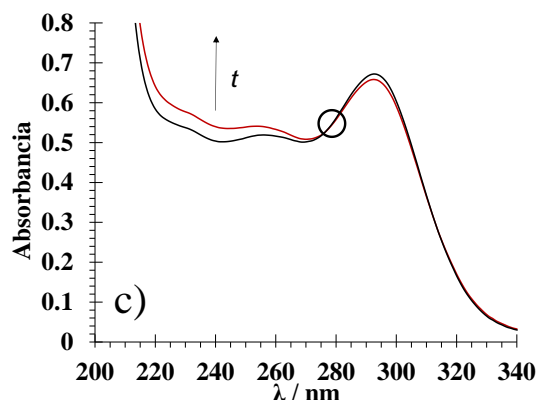




Las familias de espectros de absorción, obtenidas del estudio de estabilidad de CF en presencia de luz, así como en ausencia de burbujeo de gas  $N_2$  son presentadas en la Figura 2.6, efectuadas en soluciones buffer de fosfatos de concentración 0.2 M a pH 1.1, 6 y 10, a una concentración 24.44  $\mu M$  CF y temperatura de 25 °C. Cada una de estas familias, cuenta con dos espectros de absorción que corresponden al tiempo inicial ( $A_{t=0 \text{ min}}$ , con trazo negro) y final ( $A_{t=120 \text{ min}}$ , con trazo rojo) del estudio conducido durante dos horas, en los que es posible apreciar, un ligero efecto hipercrómico en todo el espectro de absorción obtenidos a pH 1.1 y pH 6, posiblemente porque el CF experimenta un proceso de transición en vía de alcanzar el equilibrio químico en solución, probablemente conducido a través de la formación gradual de puentes de hidrógeno con el solvente y las propias moléculas del analito, permitiendo a los cromóforos de su estructura absorber mayor cantidad de luz, sin alterar su composición química, sin embargo no hay ningún otro cambio radical que indique que el CF no sea estable durante este tiempo.

Por otra parte, al efectuar el análisis de los espectros de absorción a pH 10, es posible apreciar únicamente el desplazamiento de los hombros, sin embargo, este espectro de absorción evoluciona de manera distinta lo observado en pH 1.1 y 6, ya que además de la presencia de un efecto hipercrómico más intenso, es posible observar un cruce entre los espectros a una  $\lambda$  de 277 nm (indicado en el gráfico con una marca circular), lo que podría indicar la presencia de al menos dos especies químicas en solución, por lo que bajo estas condiciones, CF puede considerarse como inestable.

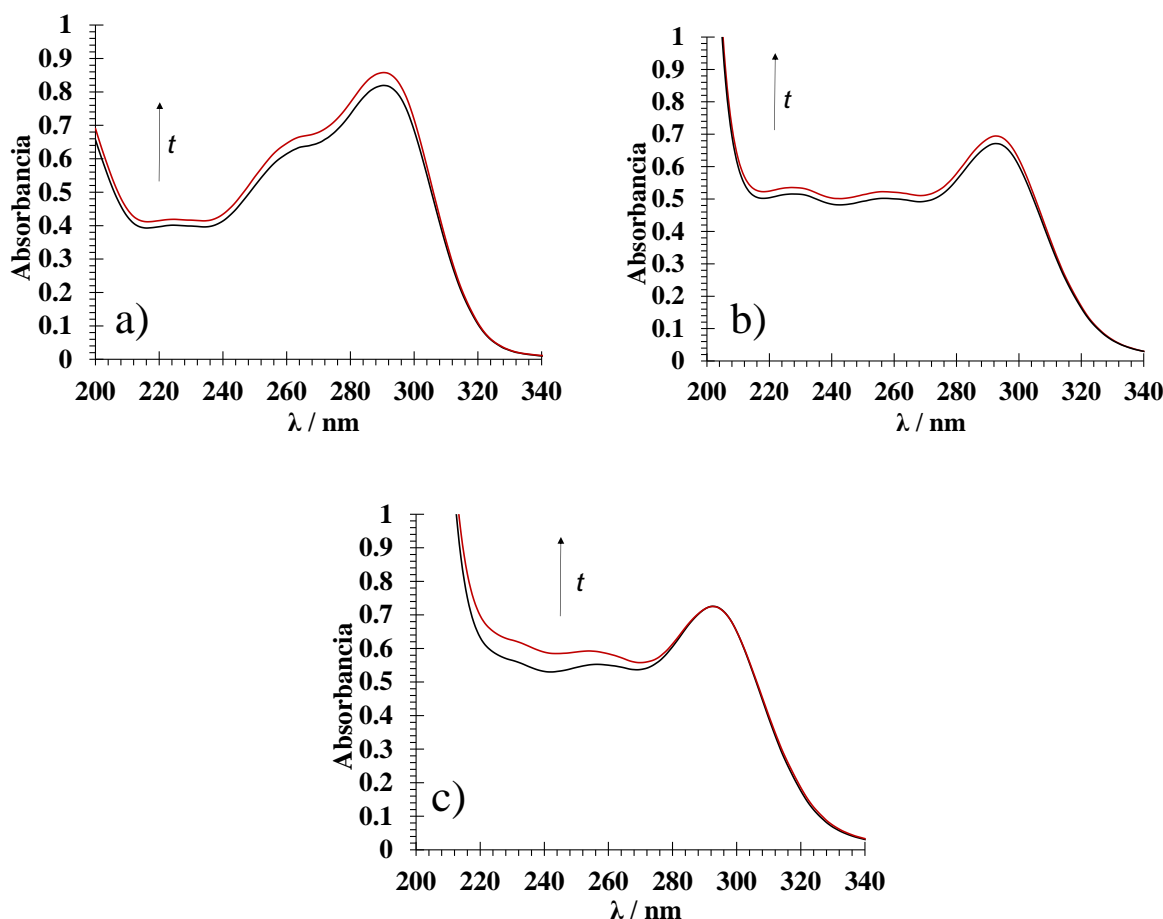




**Figura 2.6.** Familias de espectros de absorción de CF obtenidos del estudio en función del tiempo en presencia de luz y sin burbujeo continuo de  $N_2$ , para soluciones de CF a una concentración  $24.44 \mu M$  CF, en buffer de fosfatos a pH a) 1.1, b) 6 y c) 10 (—,  $A_{t=0}$ ) y (—,  $A_{t=120}$ ).

Por otro lado, las familias de espectros de absorción obtenidas del estudio en función del tiempo, pero ahora en ausencia de luz y empleando burbujeo constante de gas  $N_2$ , son presentadas en la Figura 2.7, que corresponden a soluciones buffer de fosfatos de concentración  $0.2 M$ , a pH 1.1, 6 y 10, con una concentración  $24.44 \mu M$  CF y a una temperatura de  $25^\circ C$ . De los resultados obtenidos, es posible observar que los espectros de absorción de CF conservan una estrecha relación con los discutidos previamente, ya que su evolución espectral es muy similar. Con respecto a la estabilidad, las soluciones a pH 1.1 y 6 por lo que se considera como estables, sin embargo, los efectos hipercrómicos observados son mayores que en los sistemas sin protección, por lo que probablemente el proceso de estabilización química de la solución se ve acelerado, mientras que en pH 10, es claro que los cuidados llevados a cabo en la experimentación tienen un efecto benéfico en la estabilidad de CF, ya que el cruce observado previamente de las bandas no se efectúa, y en su lugar ocurre el traslapamiento de la banda característica, por lo que la evolución de las especies de CF se ve minimizada.



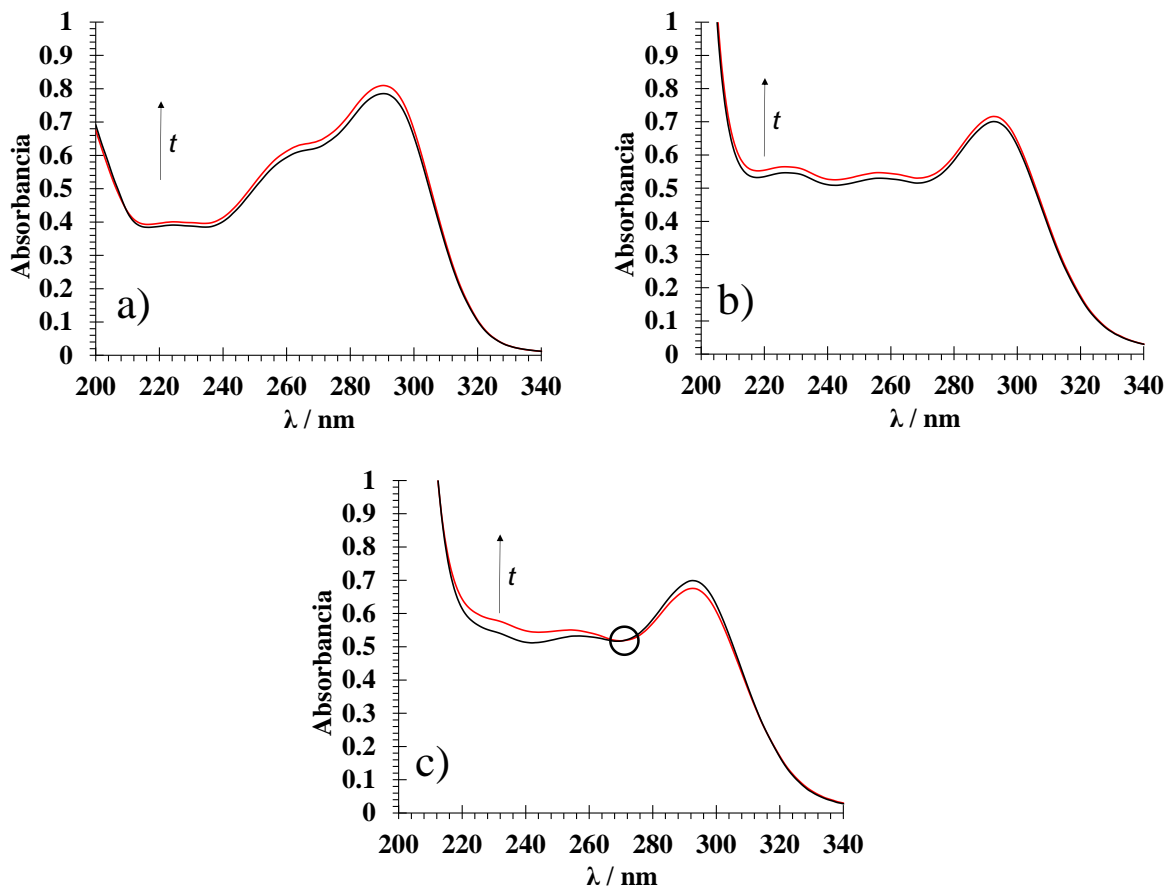


**Figura 2.7.** Familias de espectros de absorción obtenidos del estudio en función del tiempo en ausencia de luz y con burbujeo constante de gas  $N_2$ , para soluciones de CF a una concentración  $24.44 \mu M$ , en buffer de fosfatos a pH a) 1.1, b) 6 y c) 10 (—,  $A_{t=0}$ ) y (—,  $A_{t=120}$ ).

Además de llevar a cabo el estudio de estabilidad en los sistemas anteriormente descritos, una tercera evaluación es conducida en un sistema “intermedio”, en la cual solamente se protege a las soluciones de fuentes de luz. Los resultados obtenidos son presentados en la Figura 2.8, en los que es posible observar un comportamiento similar al del primer sistema estudiado, no obstante, dado que el efecto hipercrómico pareciera ser menor al observado en los dos sistemas previos, se conduce una comparación, a través de la razón expresada en porcentaje que existe entre  $A_{t=0}$  y  $A_{t=120}$ , evaluado para la banda situada alrededor de 225 nm. Los porcentajes calculados son presentados en la Tabla 2.2, en donde es evidente que las menores variaciones espectrales se alcanzan al garantizar únicamente la protección de las soluciones de la luz. Es por ello que los



resultados presentados en capítulos posteriores son reportados tomando en cuenta esta consideración.



**Figura 2.8.** Familias de espectros de absorción obtenidos del estudio en función del tiempo, en ausencia de luz, para soluciones de CF a una concentración  $24.44 \mu\text{M}$ , en buffer de fosfatos a pH a) 1.1, b) 6 y c) 10 (—,  $A_{t=0}$ ) y (—,  $A_{t=120}$ ).

**Tabla 2.2 .** Porcentaje total de cambio en la absorbancia inicial ( $A_{t=0}$ ) y final ( $A_{t=120}$ ) de la banda ubicada en  $\lambda_3$  (grupo funcional tioéster) para los diferentes valores de pH y diferentes condiciones experimentales.

pH	Sin protección de luz y oxígeno	Protección de luz y atmósfera de $\text{N}_2$	Protección de luz
	$\lambda_3 / \text{nm}$	$\lambda_3 / \text{nm}$	$\lambda_3 / \text{nm}$
1.1	3.6%	3.7%	2.7%
6	3.6%	3.1%	1.8%



10

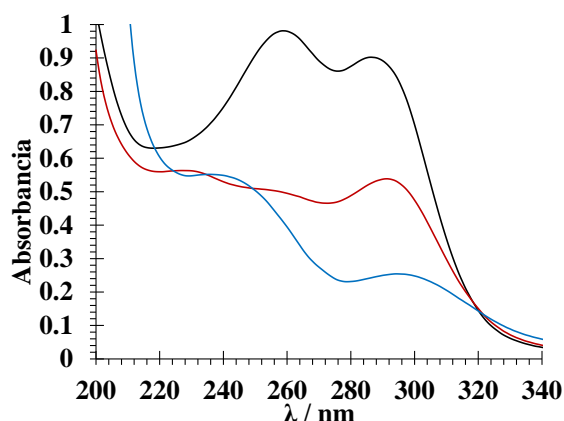
7.4%

9.6%

6.7%

#### 2.3.4. Añejamiento de las soluciones de ceftiofur

Ya que en la literatura reportada para CF no se tiene evidencia experimental del efecto del tiempo en el CF, un análisis de su comportamiento es lleva a cabo mediante el seguimiento de su evolución espectral al término de un amplio intervalo de tiempo. El añejamiento de las soluciones en buffer de fosfatos a pH 1.1, 6 y 10, con una concentración 24.44  $\mu\text{M}$  CF, se conduce por el periodo de un mes, añejando a las mismas en una cámara cerrada a STP y protegidas de la luz. Los resultados obtenidos a partir del añejamiento de las soluciones se presentan en la Figura 2.9, en los cuales es notable que tanto a pH 1.1 como 10, los espectro de absorción de CF han cambiado con respecto a lo previamente observado, ya que ha desaparecido completamente en ellos la banda cercana a 230 nm; por otro lado, el espectro de absorción obtenido en pH 6 cuenta aún con los tres máximos de absorción, los cuales permanecen en las longitudes de onda iniciales, sin embargo, la absorción observada para cada banda ha cambiado, lo cual indica que la molécula de CF ha experimentado cambios. Es probable que los espectros de absorción observados correspondan a especies químicas derivadas de la oxidación de CF como lo es el desfuroilceftiofur o alguno de los ocho posibles productos de degradación propuestos por Thomas Koshy y col. <sup>[36]</sup>, sin embargo, es necesario llevar a cabo otros estudios para poder realizar la identificación de dichas especies químicas.



**Figura 2.9.** Espectros de absorción característicos de CF en soluciones añejadas por un periodo de un mes, a una concentración 24.44  $\mu\text{M}$  CF en buffer de fosfatos a pH 1.1 (—), 6 (—) y 10 (—).



## 2.4. Conclusiones

La principal contribución del presente capítulo es el dar a conocer detalladamente el comportamiento espectral de CF, que hasta el momento era desconocido a través de cualquier propiedad física medible, su caracterización espectral con base en las reglas empíricas propuestas de J. R. Dyer, en función de los tres principales grupos funcionales que integran su estructura, siendo de gran utilidad para comprender de mejor forma los fenómenos espectrales observados en capítulos posteriores, pudiendo ser atribuidos a cambios de composición en la molécula.

Dadas las evidencias experimentales del estudio espectrofotométrico en función del tiempo, es indispensable considerar las condiciones experimentales, como pH de trabajo, protección de las condiciones de luz y atmósfera (burbujeo de  $N_2$  en la solución), ya que influyen en su comportamiento espectral. Particularmente en este trabajo, se encuentra que a valores de pH ligera o fuertemente ácidos (pH 6 y 1.1, respectivamente) son los mejores para la preservación de la estabilidad de CF, sin embargo, la inestabilidad demostrada por CF a pH alcalino (pH 10), hace necesaria una mayor investigación para garantizar el estudio de CF bajo estas condiciones se lleve a cabo en un sistema en equilibrio, asegurando que el predominio relativo de las especies químicas de CF en solución sea constante.



# Capítulo 3

## Cálculo de las constantes de acidez e inclusión de CF

### 3.1. Introducción

La compleja estructura de CF, cuenta con al menos tres protones ácidos en su estructura, y por lo tanto al menos tres constantes de acidez. Uno de estos protones ácidos podría situarse en el grupo carboxilo del grupo funcional 7-ACA, sin embargo, la asignación de los demás protones ácidos, así como sus valores de  $pK_a$  no es clara. La aproximación de estas constantes ha sido efectuada solo por algunos autores, empleando para ello programas computacionales basados en la comparación estructural de moléculas similares, e inclusive simulación teórica basada en la teoría de funcionales de la densidad, DFT. Ejemplos de ello, son los valores de  $pK_a$  reportados por Patricia Puig y col. ( $pK_{a,1}=2.6$  y  $pK_{a,2}=2.92$ , sin identificar los protones ácidos a los que pertenecen), así como la NLM (3.7, asociado al grupo carboxilo del grupo funcional 7-ACA), sin embargo, existe una diferencia evidente entre estos, por lo que su obtención a través metodologías experimentales es fundamental. Para obtenerlos, es posible recurrir a métodos espectrofotométricos, así como el uso de herramientas computacionales como SQUAD o Hyperquad <sup>[39],[50]</sup>, con las que es posible obtener valores de buena exactitud, indispensables para adecuada selección de condiciones experimentales.

La  $\beta$ -CD, por otro lado, es una molécula interesante, ya que se ha reportado que mediante su empleo es posible mejorar algunas propiedades en los analitos, como la solubilidad y estabilidad química. Además de las constantes de acidez, una metodología como la mencionada previamente posibilita la obtención de constantes termodinámicas que pueden evidenciar la formación de interacciones supramoleculares entre CF y la  $\beta$ -CD, que no han sido reportadas previamente. Es por ello, que en este capítulo se presenta la determinación de las constantes de acidez de CF y de inclusión, producto de la interacción de CF y la  $\beta$ -CD por medio de espectrofotometría UV-Vis y el uso del programa computacional SQUAD, es importante resaltar, que dado los resultados obtenidos en el capítulo anterior se toma en consideración el efecto de la luz sobre la solución, por lo que la muestras son protegidas de este contacto.



## 3.2. Metodología

### 3.2.1. Comportamiento espectral de soluciones de CF en función del pH

El estudio del comportamiento de CF en función del pH se lleva a cabo por medio de espectrofotometría UV-Vis, utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo Lambda 35, así como soluciones compuestas por CF a una concentración 24.44  $\mu\text{M}$  en solución buffer de fosfatos a pH 1.1, a las cuales se agregan volúmenes de concentración conocida de NaOH, para provocar incrementos de pH en el orden de décimas de unidad, hasta alcanzar pH 12, intervalo de pH en el cual teóricamente deberían existir cuatro especies químicas de CF, las cuales se denotan de la siguiente manera:  $\text{H}_3\text{CF}$ ,  $\text{H}_2\text{CF}^-$ ,  $\text{HCF}^{2-}$  y  $\text{CF}^{3-}$ . Los cambios químicos promovidos por la disminución de la concentración de protones en la solución son seguidos por medio de la medición del espectro de absorción de las soluciones en cada modificación del pH de la solución, en un intervalo de longitudes de onda de 200 a 600 nm. Una vez obtenida dicha información espectrofotométrica, se procesa mediante SQUAD.

### 3.2.2. Determinación del complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD

La determinación del complejo de inclusión en medio acuoso se lleva a cabo a partir de una solución de HCl (pH 0.8) a una concentración 24.44  $\mu\text{M}$  CF, a la cual se añaden alícuotas de concentración conocida de una solución de  $\beta$ -CD, abarcando las relaciones molares  $\beta$ -CD/CF: 1:1, 1:2... 1:20, realizando para cada adición una medición espectrofotométrica, en un intervalo de  $\lambda$  de 200 a 700 nm, con el objetivo de obtener evidencia experimental que respalde la formación del complejo de inclusión de CF en la cavidad hidrófoba de la  $\beta$ -CD.

### 3.2.3. Reactivos

Las soluciones utilizadas son preparadas con hidrocloreuro de CF 24.44  $\mu\text{M}$  (97.9 %), así como HCl 0.2 M (37 %), Metanol, NaOH (98 %), obtenidos de Sigma-Aldrich. Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada Tipo I (18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^2$ ) Milli-Q modelo Integral 5, burbujeada previamente con gas  $\text{N}_2$  para el desplazamiento oxígeno disuelto en las soluciones, así como protegidas de la luz.





### **3.2.4. Equipamiento**

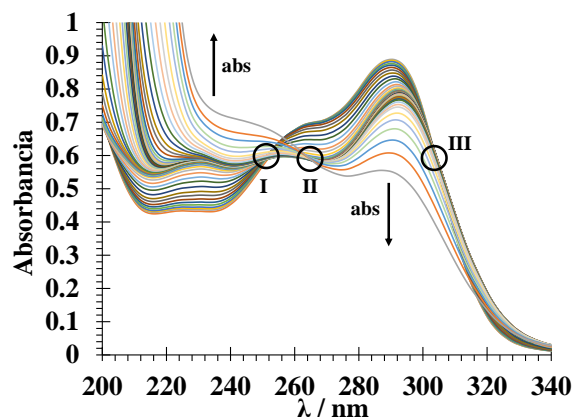
Los estudios espectrofotométricos se llevan a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 35, corriendo el software Lambda 35 para el control y adquisición de datos, así como celdas de cuarzo con longitud de paso óptico de 1 cm. El sistema utilizado para la experimentación es una parrilla de agitación IKA, modelo C-MAG HS-7, conectada a un controlador de temperatura IKA, modelo ETS-D5 con el cual se controla la temperatura de la celda a 25 °C. Las mediciones de pH se llevan a cabo en un potenciómetro Mettler Toledo modelo SevenMulti, por medio de un electrodo combinado de vidrio (dentro de un intervalo de pH de 1 a 12 unidades).

## **3.3. Resultados**

### **3.3.1. Comportamiento espectral de CF en función del pH**

La Figura 3.1 muestra la familia de espectros de absorción de CF obtenida a partir del estudio espectrofotométrico en función del pH, para la cual es posible observar que a pH ácido los espectros cuentan con tres bandas de absorción, cercanas a los valores de  $\lambda_1=290$ ,  $\lambda_2=260$  y  $\lambda_3=230$  nm. A medida que el pH de la solución es modificado hacia la basicidad, son observables efectos batocrómicos, hipsocrómicos, así como tres puntos isobésticos (nombrados como I, II y III, e identificados en la figura con una marca circular), los cuales, en este caso representan un equilibrio químico de acidez. Estos puntos, situados en valores de  $\lambda$  de 250 nm (presente desde pH 1.1 hasta pH 4.4), 266 nm (presente desde pH 4.4 hasta pH 8.2) y 303 nm (presente desde pH 1.1 hasta 10.4), sugieren la presencia de al menos tres reacciones que se desarrollan a medida que la concentración de protones en la solución disminuye, corroborando por ende la presencia de al menos cuatro especies en solución a lo largo del intervalo de pH de trabajo.





**Figura 3.1.** Espectros de absorción obtenidos del estudio espectrofotométrico de CF en función del pH, a una concentración 24.44  $\mu\text{M}$ , en buffer de fosfatos 0.2 M y en un rango de pH de 1.1 a 12.

### 3.3.2. Cálculo de las constantes de acidez de CF

Para llevar a cabo la determinación de los valores de  $\text{pK}_a$  de CF, se alimentan al programa computacional SQUAD los espectros de absorción obtenidos del estudio espectrofotométrico en función del pH, la concentración de CF en la solución, los valores de pH utilizados para llevar a cabo las mediciones, un modelo químico propuesto que incluye a las especies químicas que CF es capaz de formar en función del pH, así como valores propuestos de las constantes de acidez. Estos valores de  $\text{pK}_a$ , son obtenidos a partir de una simulación por medio del programa computacional ACD/Labs, generando como resultado que CF cuenta con seis protones que pueden disociarse de su estructura, no obstante, tres de ellos no lo son en medios acuosos, por lo que en este documento no se hará referencia a los mismos. Por otro lado, del grupo de protones ácidos que pueden disociarse dentro del intervalo de pH de 0 a 14, el primero de ellos se encuentra asociado al protón del grupo carboxilo en el grupo funcional 7-ACA con un valor de  $\text{pK}_a$  de 2.62, mientras que dos más se encuentran en aminas, la primera de ellas se localiza en el grupo funcional 7-ACA, mientras que la segunda en el grupo iminometoxi con valores de  $\text{pK}_a$  de 2.90 y 8.04, respectivamente. Estos valores, que hasta antes de la redacción de este documento no habían sido reportados, permiten en conjunto la posibilidad de que CF pueda formar en solución cuatro especies químicas distintas, a las que se otorga la siguiente nomenclatura:  $\text{H}_3\text{CF}$  (totalmente protonada),  $\text{H}_2\text{CF}^+$  (diprotonada),  $\text{HCF}^{2+}$  (zwitterionica) y  $\text{CF}^{3+}$  (libre); información que finalmente es incluida dentro del modelo químico mencionado. Los detalles del procedimiento iterativo que SQUAD emplea para la



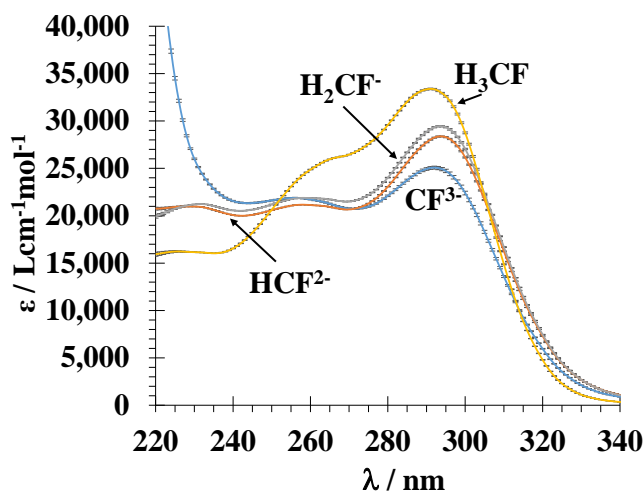
determinación de los valores de  $pK_a$  pueden ser consultados con más detalle en el Anexo A de este documento. Como resultado del tratamiento que realiza SQUAD, el programa provee valores estadísticos de desviación estándar,  $\sigma$ , así como suma de cuadrados,  $U^2$ , que para la información alimentada corresponden a valores de  $6.79 \times 10^{-3}$  y  $3.18 \times 10^{-1}$ , respectivamente. En la Tabla 3.1, son presentadas las constantes de acidez de CF obtenidas en este trabajo, mediante simulación y de manera experimental; de la cual, al realizar una comparación entre pares, es posible advertir que existen diferencias notables, siendo la mayor de ellas la que presenta el segundo equilibrio químico con una variación de hasta 3.97 U, sin embargo, dicha diferencia podría tener como origen la evolución natural de CF en la solución por efecto del tiempo que involucra la experimentación. Adicional a estas constantes, en la Figura 3.2 se presentan gráficamente los coeficientes de absortividad molar de CF obtenidos mediante SQUAD, además de sus análogos numéricos en Tabla 3.2, en los que se aprecian los perfiles característicos de cada una de las cuatro especies químicas de CF, cuyas correspondientes desviaciones estándar son muy inferiores al 3 %.

**Tabla 3.1** Comparativa de las constantes de acidez de CF, obtenidas mediante simulación con el programa ACD/Labs y experimentalmente, determinadas mediante SQUAD.

	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	$pK_{a,3}$
<b>Equilibrio</b>	$H_3CF \rightleftharpoons H_2CF^-$	$H_2CF^- \rightleftharpoons HCF^{2-}$	$HCF^{2-} \rightleftharpoons CF^{3-}$
<b>ACD/Labs.</b> <sup>[37]</sup>	$2.62 \pm 0.50$	$2.90 \pm 0.50$	$8.04 \pm 0.40$
Experimental (CI <sup>-</sup> )	$3.300 \pm 0.020$	$6.67 \pm 0.20$	$10.97 \pm 0.470$

\* Se alimentaron a SQUAD 34 espectros de absorción con  $142 \lambda$  cada uno.  $\sigma = 6.79 \times 10^{-3}$  y  $U^2 = 3.18 \times 10^{-1}$ .





**Figura 3.2.** Coeficientes de absorptividad molar de las cuatro especies encontradas que CF es capaz de formar en el intervalo de pH de estudio, las barras de error respectivas se encuentran indicadas en el gráfico.

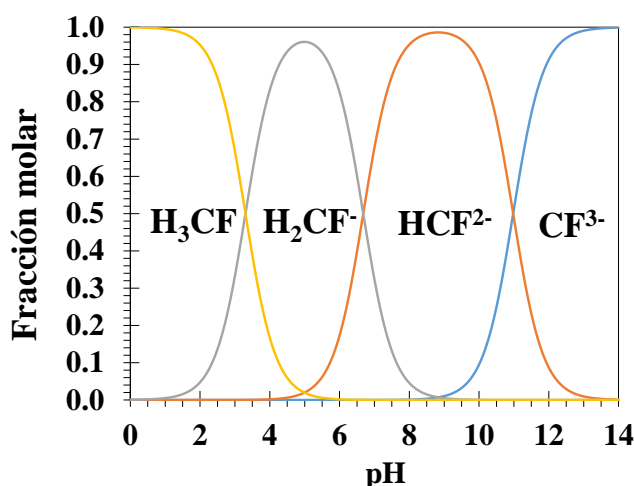
**Tabla 3.2** Valores numéricos de los  $\epsilon$  como su error asociado para cada una de las cuatro especies químicas de CF, determinadas para una concentración 24.44  $\mu\text{M}$ .

$\lambda / \text{nm}$	$\epsilon (\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 10^{-3}$			
	$\text{CF}^{3-}$	$\text{HCF}^{2-}$	$\text{H}_2\text{CF}^-$	$\text{H}_3\text{CF}$
220	$55.62 \pm 0.48$	$20.76 \pm 0.17$	$19.927 \pm 0.196$	$15.94 \pm 0.24$
224	$37.37 \pm 0.26$	$20.884 \pm 0.094$	$20.59 \pm 0.11$	$16.19 \pm 0.13$
228	$28.44 \pm 0.13$	$20.978 \pm 0.047$	$21.064 \pm 0.053$	$16.192 \pm 0.067$
232	$24.437 \pm 0.066$	$20.917 \pm 0.023$	$21.238 \pm 0.027$	$16.126 \pm 0.033$
236	$22.472 \pm 0.055$	$20.500 \pm 0.019$	$20.936 \pm 0.022$	$16.055 \pm 0.028$
240	$21.554 \pm 0.060$	$20.073 \pm 0.022$	$20.570 \pm 0.025$	$16.550 \pm 0.031$
244	$21.331 \pm 0.063$	$20.041 \pm 0.022$	$20.581 \pm 0.026$	$17.794 \pm 0.032$
248	$21.483 \pm 0.06$	$20.362 \pm 0.021$	$20.948 \pm 0.024$	$19.618 \pm 0.030$
252	$21.744 \pm 0.058$	$20.795 \pm 0.021$	$21.440 \pm 0.024$	$21.646 \pm 0.029$
256	$21.886 \pm 0.057$	$21.123 \pm 0.020$	$21.820 \pm 0.023$	$23.520 \pm 0.029$
260	$21.726 \pm 0.059$	$21.139 \pm 0.021$	$21.874 \pm 0.024$	$24.873 \pm 0.030$
264	$21.392 \pm 0.064$	$20.997 \pm 0.023$	$21.778 \pm 0.026$	$25.806 \pm 0.032$
268	$20.905 \pm 0.069$	$20.714 \pm 0.025$	$21.535 \pm 0.028$	$26.256 \pm 0.035$
272	$20.764 \pm 0.071$	$20.804 \pm 0.025$	$21.662 \pm 0.029$	$26.814 \pm 0.036$
276	$21.117 \pm 0.068$	$21.550 \pm 0.024$	$22.454 \pm 0.028$	$27.908 \pm 0.035$
280	$22.109 \pm 0.077$	$23.065 \pm 0.027$	$24.026 \pm 0.031$	$29.577 \pm 0.039$
284	$23.437 \pm 0.099$	$25.099 \pm 0.035$	$26.139 \pm 0.040$	$31.587 \pm 0.050$
288	$24.60 \pm 0.12$	$27.025 \pm 0.044$	$28.123 \pm 0.050$	$33.042 \pm 0.062$
292	$25.08 \pm 0.15$	$28.244 \pm 0.054$	$29.342 \pm 0.061$	$33.350 \pm 0.077$
296	$24.43 \pm 0.18$	$28.099 \pm 0.064$	$29.117 \pm 0.073$	$32.126 \pm 0.091$
300	$22.4 \pm 0.19$	$26.156 \pm 0.069$	$27.043 \pm 0.079$	$28.750 \pm 0.098$



304	$19.20 \pm 0.18$	$22.672 \pm 0.064$	$23.378 \pm 0.073$	$23.506 \pm 0.091$
308	$15.47 \pm 0.14$	$18.435 \pm 0.049$	$18.971 \pm 0.056$	$17.697 \pm 0.070$
312	$11.761 \pm 0.092$	$14.119 \pm 0.033$	$14.503 \pm 0.037$	$12.255 \pm 0.047$
316	$8.506 \pm 0.056$	$10.323 \pm 0.020$	$10.589 \pm 0.023$	$7.899 \pm 0.028$
320	$5.966 \pm 0.042$	$7.308 \pm 0.015$	$7.476 \pm 0.017$	$4.795 \pm 0.021$
324	$3.938 \pm 0.036$	$4.893 \pm 0.013$	$4.984 \pm 0.015$	$2.660 \pm 0.018$
328	$2.606 \pm 0.029$	$3.285 \pm 0.010$	$3.319 \pm 0.012$	$1.482 \pm 0.015$
332	$1.744 \pm 0.023$	$2.212 \pm 0.008$	$2.2100 \pm 0.0092$	$0.851 \pm 0.012$
336	$1.216 \pm 0.019$	$1.535 \pm 0.007$	$1.5110 \pm 0.0080$	$0.527 \pm 0.010$
340	$0.894 \pm 0.017$	$1.096 \pm 0.006$	$1.0560 \pm 0.0070$	$0.353 \pm 0.009$

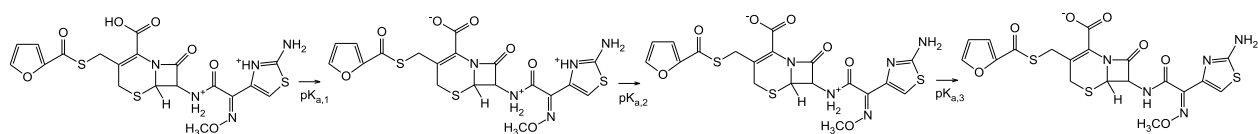
Con las constantes de acidez determinadas, es posible construir el diagrama de distribución de especies químicas de CF que se presenta en la Figura 3.3, el cual ofrece información acerca del predominio de cada especie química de CF, en fracción molar en todo el rango de pH.



**Figura 3.3.** Diagrama de distribución de las especies químicas de CF.

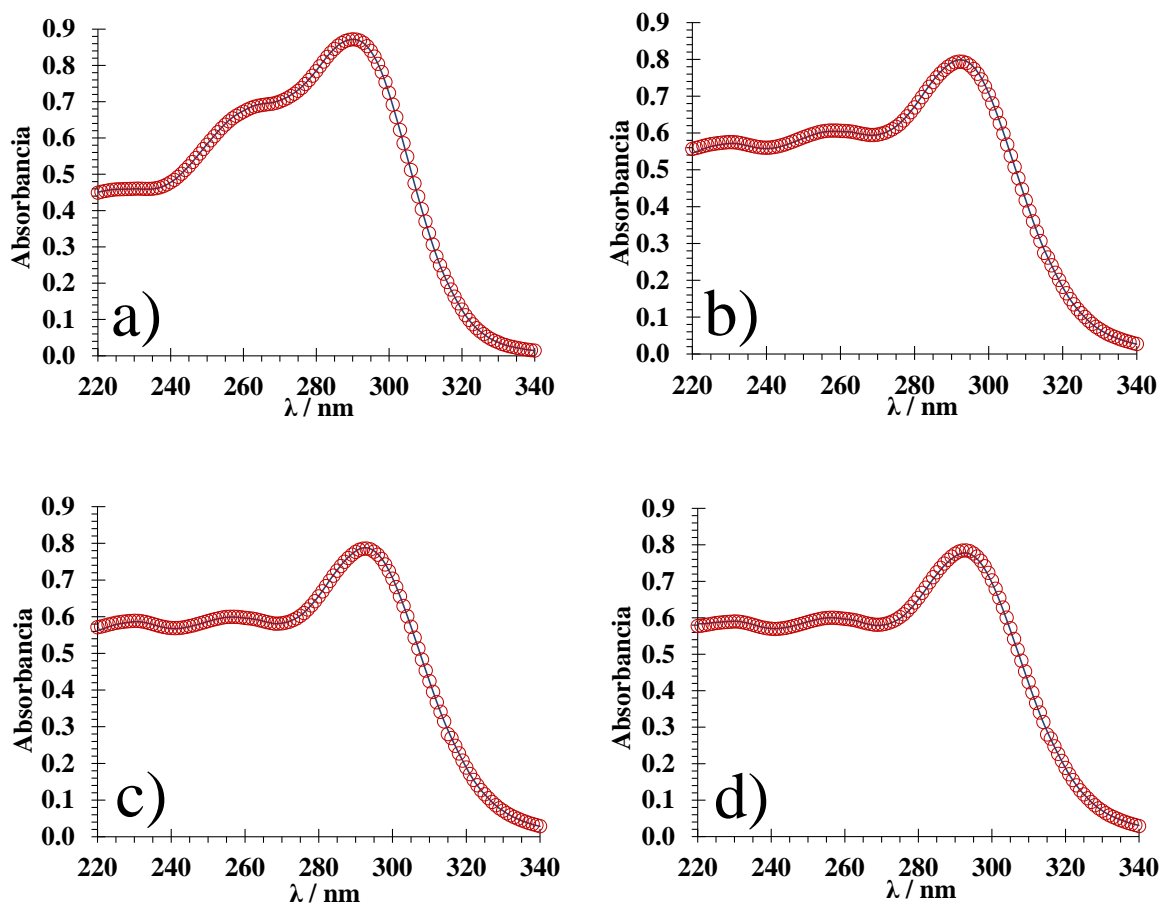
Asimismo, a partir de los resultados experimentales obtenidos del estudio de CF en función del pH, así como el conjunto de herramientas derivadas del empleo de SQUAD, es posible proponer el mecanismo de desprotonación sucesiva que se presenta en la Figura 3.4, el cual no ha sido reportado previamente y cuenta además con la capacidad para explicar de manera esquemática la razón de estos cambios observados a través de espectrofotometría.





**Figura 3.4.** Diagrama propuesto para la desprotonación sucesiva de los protones ácidos de la molécula de CF.

Con la finalidad de corroborar la precisión de los ajustes realizados, en la Figura 3.5 se presenta la comparación entre los espectros de absorción teóricos, determinados a partir del empleo de los coeficientes de absorptividad molar y la ley de aditividad (marcadores) y los obtenidos de manera experimental (líneas sólidas) para distintos valores de pH, a partir de los cuales, es claro que la emulación realizada reproduce de manera afable los resultados experimentales.



**Figura 3.5.** Comparación realizada de los espectros de absorción teóricos (O) y experimentales (—) para una concentración de CF en solución 24.44  $\mu\text{M}$ , a diferentes valores pH: a) 2.00, b) 4.01, c) 5.99 y d) 8.99.



Experimentos adicionales son efectuados para verificar si los valores de  $pK_a$  de CF, determinados en el medio con cloruros pueden obtenerse de igual forma empleando soluciones con iones fosfato y perclorato. De los resultados obtenidos (cuyos valores se presentan en la Tabla 3.3), es posible advertir que los valores de  $pK_{a,1}$  y  $pK_{a,3}$  son similares en los tres electrolitos, sin embargo, el valor de  $pK_{a,2}$  determinado en cloruros ( $Cl^-$ ) y percloratos ( $ClO_4^-$ ) discrepa del obtenido en fosfatos ( $PO_4^{3-}$ ) hasta en poco más de dos y tres unidades, respectivamente. Esta notable diferencia podría deberse a la evolución de CF influenciada por el tiempo del análisis, o en otras palabras, una estado transitorio entre los iones del solvente y el analito para establecer un equilibrio termodinámico, por lo que un estudio adicional es conducido con el propósito de minimizar el tiempo que CF se encuentra en solución y por tanto reducir esta diferencia entre constantes.

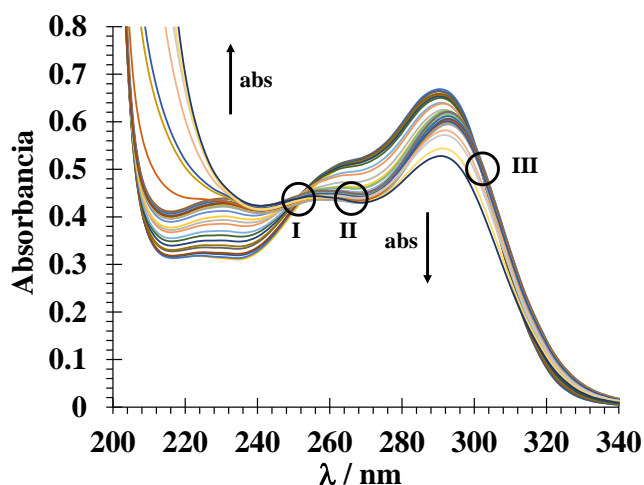
**Tabla 3.3** Constantes de acidez obtenidas para CF, a través de la aproximación con ACD/Labs y de manera experimental a través del estudio espectrofotométrico de CF en función del pH de manera continua (varios solventes), indicando la  $\sigma$  y  $U^2$  obtenidos por medio del ajuste con SQUAD.

Anión en solución	Equilibrio sucesivo			$\sigma$ $\times 10^{-3}$	$U^2$ $\times 10^{-2}$
	$H_3CF \rightleftharpoons H_2CF^-$ $pK_{a,1}$	$H_2CF^- \rightleftharpoons HCF^{2-}$ $pK_{a,2}$	$HCF^{2-} \rightleftharpoons CF^{3-}$ $pK_{a,3}$		
ACD/labs	$2.62 \pm 0.50$	$2.90 \pm 0.50$	$8.04 \pm 0.40$		
$ClO_4^-$	$2.16 \pm 0.34$	$5.51 \pm 0.82$	$10.96 \pm 0.90$	115.00	89.40
$PO_4^{3-}$	$2.090 \pm 0.040$	$3.17 \pm 0.22$	$11.28 \pm 0.22$	3.60	7.52
$Cl^-$	$3.300 \pm 0.020$	$6.67 \pm 0.20$	$10.97 \pm 0.20$	6.79	31.80

Con la finalidad de minimizar el efecto del tiempo, las constantes de acidez son determinadas nuevamente a través del empleo de una metodología que se denomina comúnmente como “análisis puntual”. Para llevar a cabo este estudio se prepara una serie de soluciones con ion  $Cl^-$  (no obstante, para su diferenciar este método del anterior la solución, en adelante se emplea la notación  $Cl^*$ ), cada una a un pH determinado, abarcando el intervalo considerado en el primer método; posteriormente a cada soluciones se añade una alícuota de concentración conocida de CF e inmediatamente después, se lleva a cabo la medición del espectro de absorción de la misma,



garantizando con ello la minimización del tiempo de análisis y la evolución del analito por efecto del tiempo. Este ensayo se repite para todos los valores de pH a considerar. La familia de espectros de absorción obtenida en el análisis puntual se presenta en la Figura 3.6, en la cual es posible observar un comportamiento similar al obtenido mediante el método de variación de pH: tres bandas de absorción a pH ácido, cuyos máximos de absorción se encuentran situados inicialmente en 291 nm para la banda característica, así como 266 y 224 nm para los dos hombros, cuyos valores de  $\lambda$  se desplazan a medida que el pH de trabajo es incrementado; además, tres puntos isosbéticos situados en 250, 266 y 303 nm, y finalmente, al igual que primer método a pH básico, se cuenta con la presencia de únicamente dos bandas con máximos de absorción situados en 291 y 255 nm.



**Figura 3.6.** Familia de espectros de absorción obtenidos del análisis puntual en una solución 24.44  $\mu\text{M}$  CF, en HCl con fuerza iónica 0.2 M y diferentes pH en un intervalo de 1.15 a 12.02

Los valores de  $\text{pK}_a$  de CF son determinados a través de SQUAD, utilizando el procedimiento descrito para el primer método espectrofotométrico; los valores obtenidos a partir del método puntual son presentados en la Tabla 3.4 e indicados como  $\text{Cl}^*$ , comparados además con los obtenidos a partir del estudio de variación de pH con iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ . De esta comparación, es notable que los valores de  $\text{pK}_a$  obtenidos por el segundo método son valores más cercanos a aquellos obtenidos por el buffer de fosfatos, cuya propiedad para soportar las variaciones de pH parecen ser adecuadas para minimizar la evolución de CF, permitiendo con ello dar identidad por a los valores de  $\text{pK}_a$  de CF reales en solución acuosa.





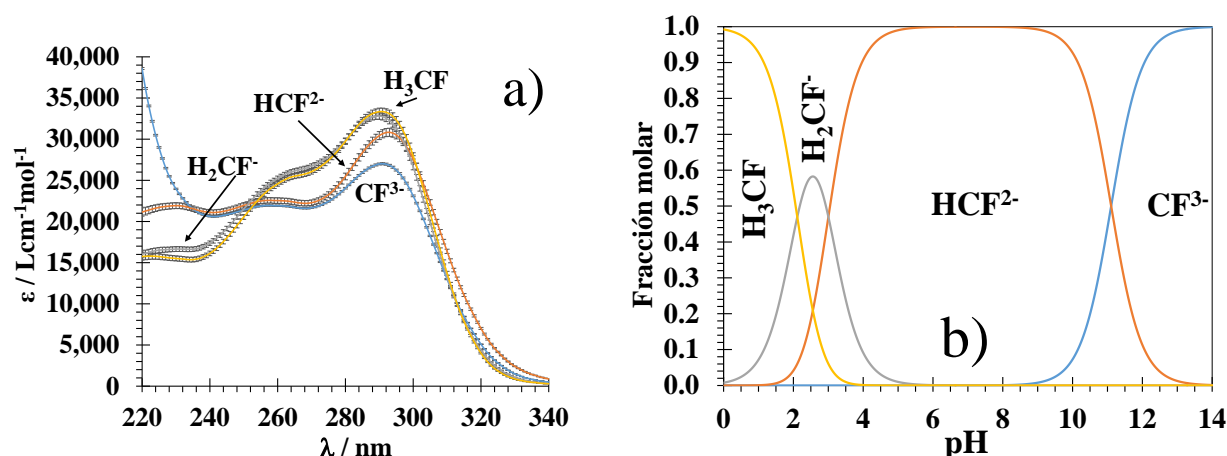
**Tabla 3.4** Constantes de acidez obtenidas para CF, a través de simulación con ACD/Labs y de manera experimental a través del estudio espectrofotométrico de CF en función del pH ( $\text{Cl}^-$ ) y puntual ( $\text{Cl}^*$ ), así como la  $\sigma$  y  $U^2$  obtenidas para cada uno por medio del ajuste con SQUAD.

Anión en solución	Equilibrio sucesivo			$\sigma$ $\times 10^{-3}$	$U^2$ $\times 10^{-2}$
	$\text{H}_3\text{CF} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CF}^-$ $\text{pK}_{a,1}$	$\text{H}_2\text{CF}^- \rightleftharpoons \text{HCF}^{2-}$ $\text{pK}_{a,2}$	$\text{HCF}^{2-} \rightleftharpoons \text{CF}^{3-}$ $\text{pK}_{a,3}$		
$\text{PO}_4^{3-}$	<b><math>2.09 \pm 0.04</math></b>	<b><math>3.17 \pm 0.22</math></b>	<b><math>11.28 \pm 0.22</math></b>	<b>3.60</b>	<b>7.52</b>
$\text{Cl}^-$	$3.30 \pm 0.02$	$6.67 \pm 0.20$	$10.97 \pm 0.20$	6.79	31.80
$\text{Cl}^*$	<b><math>2.11 \pm 0.03</math></b>	<b><math>3.00 \pm 0.24</math></b>	<b><math>11.10 \pm 0.24</math></b>	<b>7.04</b>	<b>17.90</b>

\* Se alimentaron a SQUAD 34 espectros de absorción con  $142 \lambda$  cada uno.  $\sigma = 7.04 \times 10^{-3}$ ,  $U^2 = 1.79 \times 10^{-1}$ .

Utilizando la información obtenida por medio de SQUAD, en la Figura 3.7 son presentados los  $\epsilon$  para cada una de las especies químicas de CF (con sus respectivas barras de error, cuyos valores numéricos pueden consultarse en la Tabla 3.5), así como el diagrama de distribución de especies químicas (construido a partir de las constantes de acidez presentadas anteriormente) a lo largo del intervalo de pH. Si bien estos valores de  $\text{pK}_a$  son cercanos a los reportados mediante simulación, es necesario tener especial atención al seleccionar el pH de trabajo para poder asegurar el predominio de una sola especie química y no una competición entre especies por el predominio, es por ello necesario llevar a cabo una revisión crítica de las evidencias reportadas en la literatura, particularmente de trabajos analíticos y electroanalíticos, ya que los valores de pH utilizados podrían encontrarse muy cerca de estas constantes, abriendo la posibilidad de que los resultados presentados se deban a una competición entre especies que pudiese no ser reproducible.





**Figura 3.7.** a) Coeficientes de absorptividad molar (con las barras de error respectivas) de las cuatro especies químicas de CF obtenidas mediante SQUAD a una concentración 24.44  $\mu\text{M}$ , b) Diagrama de distribución de especies de CF, calculado a partir de los  $\text{pK}_a$  de CF obtenidos mediante SQUAD por medio del análisis puntual:  
 $\text{H}_3\text{CF}$  (—),  $\text{H}_2\text{CF}^-$  (—),  $\text{HCF}^{2-}$  (—) y  $\text{CF}^{3-}$  (—).

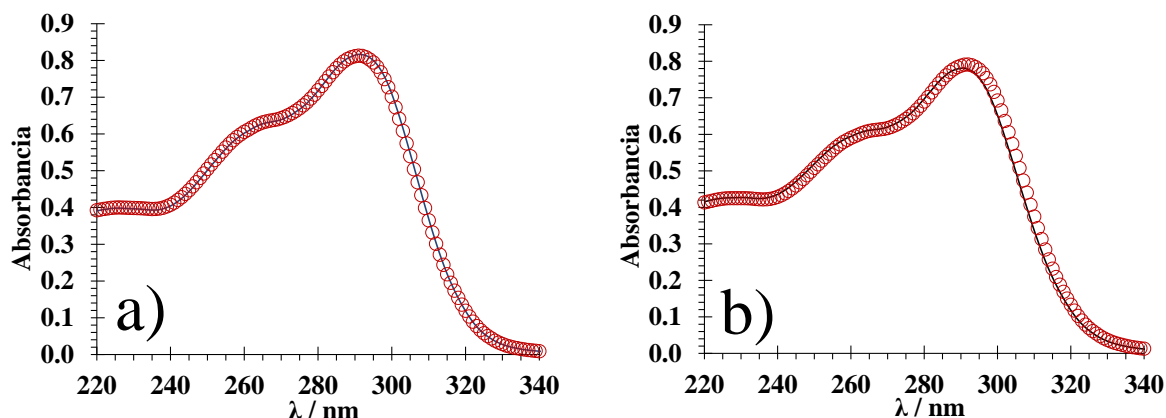
**Tabla 3.5** Coeficientes de absorptividad molar (con sus respectivas desviaciones) de las especies químicas de CF, calculados a una concentración 24.44  $\mu\text{M}$  por medio del análisis puntual.

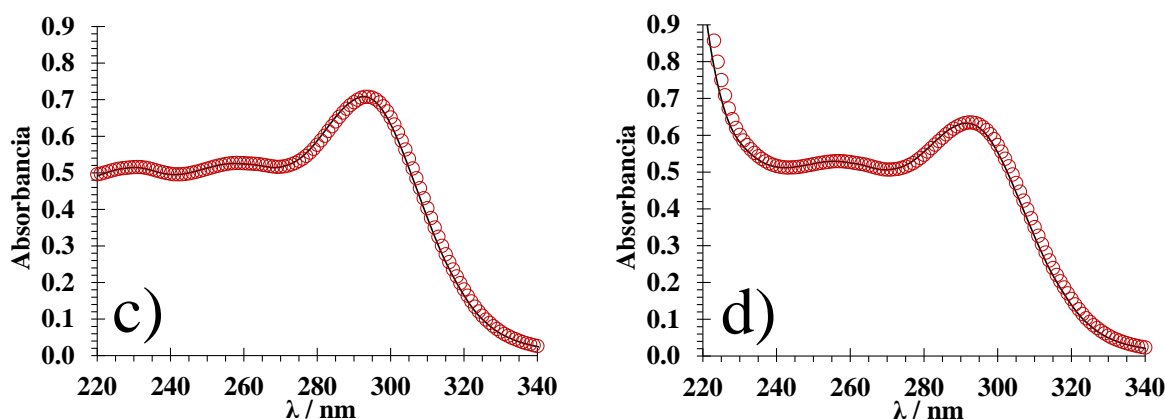
$\lambda$ / nm	$\epsilon$ ( $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) $\times 10^{-3}$			
	$\text{CF}^{3-}$	$\text{HCF}^{2-}$	$\text{H}_2\text{CF}^-$	$\text{H}_3\text{CF}$
220	$67.84 \pm 0.46$	$21.969 \pm 0.087$	$17.73 \pm 0.35$	$16.66 \pm 0.31$
224	$42.31 \pm 0.26$	$22.346 \pm 0.049$	$18.28 \pm 0.20$	$16.76 \pm 0.18$
228	$31.97 \pm 0.14$	$22.584 \pm 0.027$	$18.55 \pm 0.11$	$16.68 \pm 0.10$
232	$28.25 \pm 0.10$	$22.589 \pm 0.020$	$18.682 \pm 0.079$	$16.619 \pm 0.071$
236	$26.64 \pm 0.11$	$22.202 \pm 0.021$	$18.732 \pm 0.084$	$16.714 \pm 0.074$
240	$25.95 \pm 0.11$	$21.892 \pm 0.022$	$19.247 \pm 0.088$	$17.490 \pm 0.078$
244	$25.65 \pm 0.11$	$21.998 \pm 0.021$	$20.369 \pm 0.085$	$19.004 \pm 0.075$
248	$25.46 \pm 0.10$	$22.386 \pm 0.019$	$21.903 \pm 0.076$	$21.004 \pm 0.067$
252	$25.231 \pm 0.087$	$22.820 \pm 0.016$	$23.506 \pm 0.067$	$23.095 \pm 0.059$
256	$24.783 \pm 0.074$	$23.059 \pm 0.014$	$24.863 \pm 0.057$	$24.935 \pm 0.051$
260	$24.089 \pm 0.067$	$22.950 \pm 0.013$	$25.7160 \pm 0.052$	$26.138 \pm 0.046$
264	$23.164 \pm 0.063$	$22.691 \pm 0.012$	$26.240 \pm 0.048$	$26.913 \pm 0.043$
268	$22.228 \pm 0.063$	$22.343 \pm 0.012$	$26.424 \pm 0.049$	$27.206 \pm 0.043$
272	$21.766 \pm 0.070$	$22.540 \pm 0.013$	$26.893 \pm 0.054$	$27.870 \pm 0.048$
276	$21.606 \pm 0.088$	$23.446 \pm 0.017$	$27.909 \pm 0.068$	$29.071 \pm 0.060$
280	$22.08 \pm 0.11$	$25.186 \pm 0.021$	$29.589 \pm 0.086$	$30.899 \pm 0.076$
284	$22.75 \pm 0.13$	$27.375 \pm 0.025$	$31.49 \pm 0.10$	$32.891 \pm 0.091$
288	$23.13 \pm 0.15$	$29.218 \pm 0.029$	$32.74 \pm 0.12$	$34.08 \pm 0.11$
292	$22.83 \pm 0.17$	$30.198 \pm 0.032$	$32.79 \pm 0.13$	$34.06 \pm 0.11$
296	$21.58 \pm 0.17$	$29.568 \pm 0.032$	$31.06 \pm 0.13$	$32.34 \pm 0.12$



300	$19.36 \pm 0.16$	$27.058 \pm 0.029$	$27.3 \pm 0.12$	$28.35 \pm 0.11$
304	$16.4 \pm 0.13$	$23.115 \pm 0.024$	$22.18 \pm 0.10$	$22.767 \pm 0.087$
308	$13.27 \pm 0.1$	$18.578 \pm 0.019$	$16.843 \pm 0.078$	$16.811 \pm 0.069$
312	$10.193 \pm 0.073$	$14.111 \pm 0.014$	$12.035 \pm 0.056$	$11.466 \pm 0.050$
316	$7.558 \pm 0.054$	$10.342 \pm 0.010$	$8.217 \pm 0.042$	$7.343 \pm 0.037$
320	$5.453 \pm 0.040$	$7.2550 \pm 0.0080$	$5.346 \pm 0.031$	$4.399 \pm 0.027$
324	$3.812 \pm 0.029$	$4.8770 \pm 0.0050$	$3.332 \pm 0.022$	$2.501 \pm 0.020$
328	$2.628 \pm 0.031$	$3.3010 \pm 0.0060$	$2.066 \pm 0.024$	$1.478 \pm 0.021$
332	$1.840 \pm 0.027$	$2.2460 \pm 0.0050$	$1.315 \pm 0.021$	$0.930 \pm 0.019$
336	$1.388 \pm 0.029$	$1.5870 \pm 0.0050$	$0.893 \pm 0.022$	$0.645 \pm 0.020$
340	$1.048 \pm 0.053$	$1.104 \pm 0.010$	$0.638 \pm 0.041$	$0.462 \pm 0.036$

Con la finalidad de evaluar la precisión de los ajustes realizados, en la Figura 3.5 se presenta la comparación entre los espectros de absorción teóricos, determinados a partir del empleo de los coeficientes de absortividad molar y la ley de aditividades (marcadores) y los obtenidos de manera experimental (líneas sólidas) para distintos valores de pH del análisis puntual, consiguiendo de manera general logra ser una buena emulación de los espectros.





**Figura 3.8.** Comparación realizada de los espectros de absorción teóricos (○) y experimentales (—) para una concentración de CF en solución 24.44  $\mu\text{M}$ , a diferentes pH: a) 1.80, b) 2.81, c) 6.60 y d) 11.38.

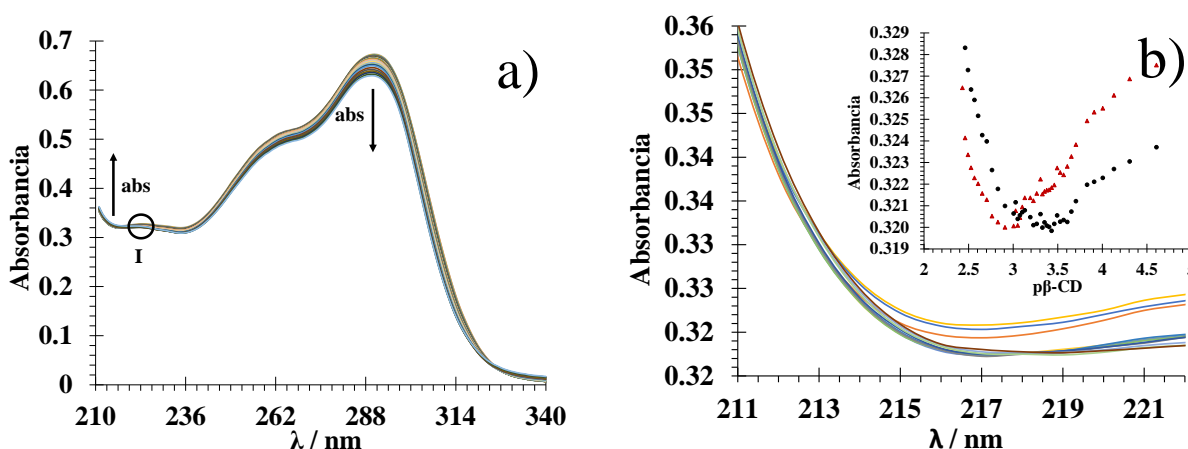
### 3.3.3. Cálculo de la constante de inclusión del complejo supramolecular CF- $\beta$ -CD

La  $\beta$ -CD es una sustancia ampliamente utilizada por la industria farmacéutica y alimentaria debido a su capacidad para albergar en su cavidad hidrófoba a moléculas con polaridad afín, formando entonces un complejo denominado “de inclusión” que otorga un efecto de “protector” al huésped, favoreciendo la solubilidad del analito en el medio y mejorando su estabilidad química. Es por ello, que a continuación se presenta un estudio de complejación de CF con  $\beta$ -CD, con la finalidad de evaluar si la formación dicho complejo es posible en un sistema compuesto por una solución de HCl, y a una concentración 20  $\mu\text{M}$  CF, y en la que se lleva a cabo el procedimiento descrito en la sección 3.2.2.

En la Figura 3.9a se presenta la familia de espectros de absorción obtenidos del estudio de complejación, acotados en un intervalo de 210 a 340 nm. En este conjunto de espectros de absorción es posible observar la presencia dos bandas de absorción en valores de  $\lambda_1=224$  y  $\lambda_3=291$  nm, cuya longitud de onda es desplazada a valores de  $\lambda_1=223$  y  $\lambda_3=290$  nm a medida que la concentración de  $\beta$ -CD en el sistema se incrementa; mientras que el hombro ubicado en  $\lambda_2=266$  nm permanece situado en la misma posición durante todo el ensayo. Estos cambios, presentes durante la evolución espectral de CF, se encuentran acompañados por la aparición de un punto isobéstico situado en un valor de  $\lambda_1 = 223$ , que puede ser atribuido a la evolución de las especies químicas libre ( $\text{H}_3\text{CF}$ ) y complejada ( $\text{H}_3\text{CF}-\beta\text{-CD}$ ) en solución. Para ejemplificar de mejor manera el cambio experimentado por el sistema debido a la adición de  $\beta$ -CD, en la Figura 3.9b se presenta



un acercamiento a la zona del punto isosbético, en el que es posible observar un cruce entre espectros; además, en el inserto de la figura se presenta la dependencia de la absorbancia (evaluada a 216 y 224 nm) en función del  $p\beta$ -CD ( $-\log[\beta\text{-CD}]$ ), en donde hay un cambio de pendiente en 3, el cual puede ser atribuido a la formación del complejo, CF- $\beta$ -CD.



**Figura 3.9.** a) Familia de espectros de absorción obtenidos del estudio de complejación de CF a una concentración 20  $\mu\text{M}$ , en una solución de HCl 0.2 M (pH 0.8), en función de la concentración de  $\beta$ -CD, para un intervalo de  $2.47 \times 10^{-5}$  a  $3.71 \times 10^{-3}$  M. b) Acercamiento del espectro de absorción en la zona del punto isosbético I. El inserto de la figura muestra la absorbancia de la solución en función del  $p\beta$ -CD evaluados para valores de  $\lambda$  de 216 y 224 nm.

La determinación de la constante de inclusión a partir de los datos espectrofotométricos es conducida mediante SQUAD y considerando una relación 1:1, a través de un procedimiento similar al descrito en la subsección 3.2.1 para la determinación del valor de  $pK_a$ , pero empleando para ello un intervalo de  $p\beta$ -CD ( $-\log([\beta\text{-CD}])$ ) de 2.70 a 4.30. En la Tabla 3.6 se presenta el valor de la constante de inclusión, en donde el valor de la constante de inclusión cuenta con un valor de  $3.038 \pm 0.008$ , en donde además, si se evalúa dicho valor con respecto a la concentración de CF en el sistema, la concentración de  $\beta$ -CD es 30.9 veces mayor, concordando entonces con el cambio de tendencia previamente observado en la Figura 3.9.

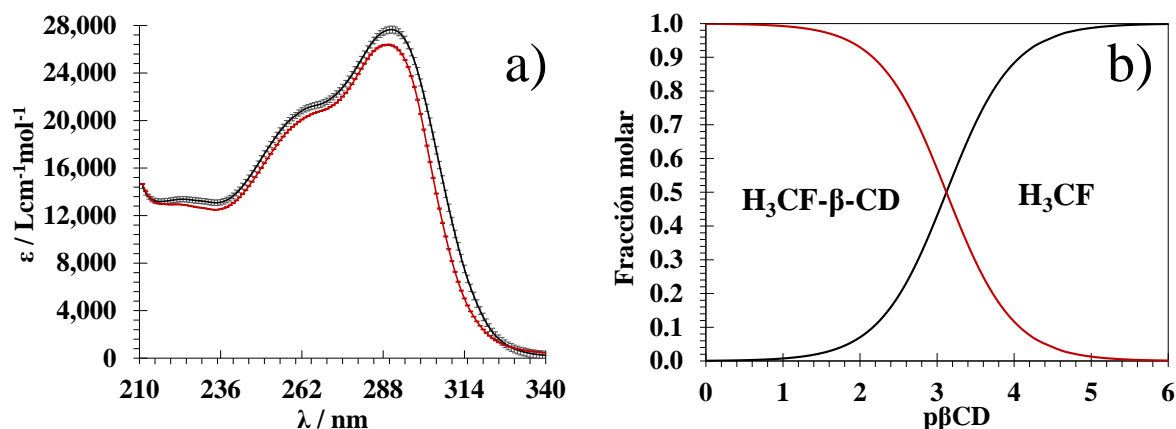


**Tabla 3.6** Constante de equilibrio, producto de la inclusión de CF en la  $\beta$ -CD, determinada mediante SQUAD.

	$pK_i$	$\sigma$	$U^2$
Equilibrio	$H_3CF \rightleftharpoons H_3CF-\beta\text{-CD}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-3}$
Valor experimental	$3.1210 \pm 0.0085$	1.10	4.32

\* Se alimentaron a SQUAD 29 espectros de absorción con 129  $\lambda$  cada uno.  $\sigma = 1.10 \times 10^{-3}$   $U^2 = 4.32 \times 10^{-3}$ .

En la Figura 3.10a, así como la Tabla 3.7, se muestran los coeficientes de absortividad molar (más las respectivas desviaciones estándar) obtenidos a partir de SQUAD para de cada una de las especies químicas en el sistema, es decir,  $H_3CF$  y  $H_3CF-\beta\text{-CD}$ , mientras que en el diagrama de distribución de especies de la Figura 3.10b se muestra su predominio en función del  $p\beta\text{-CD}$  impuesto en el sistema.



**Figura 3.10.** a) Coeficientes de absortividad molar de la especie  $H_3CF$  (O) y  $H_3CF-\beta\text{-CD}$  (O).  
b) Diagrama de distribución de especies químicas en función del  $p\beta\text{-CD}$ .

**Tabla 3.7** Coeficientes de absortividad molar de las especies químicas de CF, calculados a una concentración 20  $\mu\text{M}$  por medio del análisis puntual.

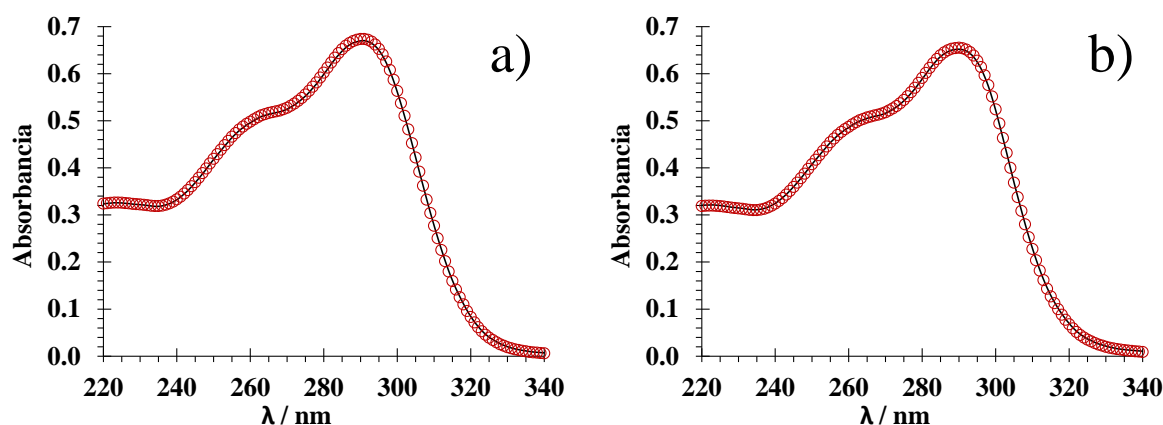
$\lambda / \text{nm}$	$\epsilon (\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 10^{-3}$	
	$\text{CF}^{3-}$	$\text{HCF}^{2-}$
211	$14.305 \pm 0.024$	$14.505 \pm 0.013$
215	$13.076 \pm 0.029$	$13.002 \pm 0.016$
219	$13.057 \pm 0.031$	$12.802 \pm 0.016$
223	$13.198 \pm 0.030$	$12.783 \pm 0.016$



227	13.131 ± 0.028	12.605 ± 0.015
231	13.018 ± 0.026	12.428 ± 0.014
235	12.91 ± 0.025	12.314 ± 0.014
239	13.293 ± 0.025	12.678 ± 0.014
243	14.284 ± 0.025	13.598 ± 0.013
247	15.746 ± 0.025	14.964 ± 0.013
251	17.379 ± 0.027	16.509 ± 0.014
255	18.895 ± 0.028	17.991 ± 0.015
259	19.999 ± 0.033	19.107 ± 0.018
263	20.738 ± 0.037	19.872 ± 0.020
267	21.078 ± 0.040	20.328 ± 0.022
271	21.555 ± 0.040	20.730 ± 0.022
275	22.523 ± 0.040	21.590 ± 0.022
279	23.986 ± 0.045	23.033 ± 0.024
283	25.706 ± 0.050	24.695 ± 0.027
287	26.970 ± 0.055	25.693 ± 0.03
291	27.336 ± 0.054	25.752 ± 0.029
295	26.494 ± 0.053	24.538 ± 0.028
299	23.854 ± 0.048	21.214 ± 0.026
303	19.619 ± 0.048	16.046 ± 0.026
307	14.776 ± 0.052	11.013 ± 0.028
311	10.236 ± 0.054	7.000 ± 0.029
315	6.520 ± 0.046	4.291 ± 0.024
319	3.916 ± 0.036	2.665 ± 0.019
323	2.140 ± 0.029	1.661 ± 0.015
327	1.178 ± 0.024	1.133 ± 0.013
331	0.657 ± 0.023	0.807 ± 0.012
335	0.394 ± 0.021	0.631 ± 0.011
339	0.254 ± 0.021	0.525 ± 0.011

Finalmente, para evaluar la calidad del ajuste efectuado, en la Figura 3.11 se presenta una comparación entre los espectros de absorción teóricos contruidos a partir de la información obtenida de SQUAD y con los obtenidos experimentales, a partir de la que es posible advertir que dicha emulación es de buena calidad, debido a la buena precisión ( $\sigma = 1.10 \times 10^{-3}$ ) y exactitud ( $U^2 = 4.32 \times 10^{-3}$ ) obtenidos del ajuste.





**Figura 3.11.** Comparación de los espectros de absorción obtenidos por emulación (○) y los obtenidos experimentalmente (—) a dos diferentes valores concentración de  $\beta$ -CD: a)  $1.48 \times 10^{-3}$  y b)  $4.94 \times 10^{-5}$  M.

### 3.4. Conclusiones

La principal contribución de este capítulo es la determinación experimental de las tres constantes de acidez de CF asociadas a los protones ácidos de su estructura. Estos valores de  $pK_a$ , nunca antes reportados en la literatura, fueron calculados mediante el programa computacional SQUAD, considerando para ello distintos solventes, así como el efecto que el tiempo de análisis tiene en la evolución del analito, previamente observado en el Capítulo 1. La utilización del análisis puntual, probó ser un método más efectivo para la aseguiridad de los valores de  $pK_a$  de CF, no sólo por la minimización de la influencia del tiempo de análisis y la posible formación de productos de oxidación que generan un mayor error experimental, sino también por la obtención de mejores emulaciones de los datos experimentales, por lo que los valores de  $pK_{a,1} = 2.11 \pm 0.03$ ,  $pK_{a,2} = 3.00 \pm 0.24$  y  $pK_{a,3} = 11.10 \pm 0.24$  pueden ser considerados como confiables. Las notables diferencias observadas para los valores de  $pK_a$  en los distintos solventes utilizados, pueden ser atribuidas a las interacciones de sus iones con la molécula de CF, permitiendo que, en el caso de  $Cl^-$  y  $ClO_4^-$  se presente una evolución del analito que desplaza estos valores a pH más básicos, en contraste con el buffer de fosfatos parece minimiza este estado transitorio del sistema.

El estudio de complejación efectuado, permitió conocer que el complejo supramolecular CF- $\beta$ -CD es posible. Dado que los cambios más importantes observados en el espectro de absorción se





localizan en la banda correspondiente al grupo tioéster de la molécula (visible a través de un punto isosbético), es posible que el complejo se produzca a raíz de la inclusión de este grupo dentro de la cavidad hidrófoba de la  $\beta$ -CD. Los parámetros de ajuste obtenidos para esta determinación, son inclusive mejores a los obtenidos al igual que en el la determinación de las constantes de acidez.



# Capítulo 4

## Caracterización electroquímica de CF en EPC

### 4.1. Introducción

El uso de metodologías electroquímicas para determinaciones analíticas, se ha vuelto un tema relevante y atractivo, debido a que es posible subyugar algunos de los aspectos por los cuales técnicas de alto rendimiento como la cromatografía líquida (HPLC) y la electroforesis capilar (EC) son consideradas como poco aptas para estudios en campo, como los altos costos que conlleva efectuar mediciones, la difícil asequibilidad de los materiales y reactivos utilizados, los largos tiempos de análisis requeridos, así como la imposibilidad de miniaturizar los sistemas empleados. En particular, la molécula de CF ha sido poco estudiada, debido a su complejidad estructural, que además dificulta la determinación de parámetros fisicoquímicos como lo son sus constantes de acidez. En el Capítulo 1 se ha mencionado que, dentro de la literatura electroquímica reportada para CF existe constancia de determinaciones conducidas exitosamente por Marcos Jaques y col. <sup>[31]–[33]</sup>, en soluciones sintéticas y reales, no obstante, debido a que en estos trabajos son empleados materiales tóxicos como electrodos de gota de mercurio (HDME), es imprescindible tomar un nuevo camino que permita alcanzar el mismo objetivo, pero con un menor nivel de riesgo, utilizando materiales acordes a lo dispuesto en los 12 principios de la química verde <sup>[51]</sup>, es por ello, que en este capítulo, se estudia el comportamiento electroquímico de CF a través de un electrodo de trabajo alternativo al HDME, denominado como electrodo de pasta de carbono (EPC).

### 4.2. Metodología

#### 4.2.1. Fabricación del EPC

El EPC es fabricado por medio de la metodología propuesta por Martínez y col. <sup>[42]</sup>, en la cual se mezcla grafito y aceite mineral en una proporción 1:1, hasta conseguir una pasta de consistencia homogénea. Posteriormente, es introducida en un contenedor plástico, compactándola para evitar



la formación de burbujas de aire, y finalmente, es insertado un conector para establecer el contacto eléctrico hacia el potenciostato-galvanostato.

#### **4.2.2. Montaje de la celda electroquímica**

Las mediciones electroquímicas se llevan a cabo en una celda típica de tres electrodos, la cual contiene un EPC como electrodo de trabajo, WE, con un diámetro interno de  $0.07 \text{ cm}^2$  [46], un electrodo Ag/AgCl<sub>sat</sub> como referencia, RE, así como un alambre de platino como contra electrodo, CE.

#### **4.2.3. Reactivos**

Las soluciones utilizadas son preparadas con clorhidrato de CF  $24.44 \mu\text{M}$  (97.9 %), así como HCl  $0.2 \text{ M}$  (37 %), Metanol y NaOH (98 %), obtenidos de Sigma-Aldrich. Todas las soluciones son preparadas con agua desionizada Tipo I ( $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) obtenida de un desionizador Milli-Q, modelo Integral 5, previamente burbujeadas con  $\text{N}_2$ , así como protegidas de fuentes de luz.

#### **4.2.4. Equipamiento**

Los estudios electroquímicos se llevan a cabo utilizando un potenciostato galvanostato BASi, modelo Epsilon acoplado a un módulo de electrodo rotatorio RDE-2, corriendo el software Epsilon electrochemical (Epsilon EC) para el control y adquisición de datos, además de una celda termostatada a  $25^\circ\text{C}$ .

#### **4.2.5. Métodos electroquímicos**

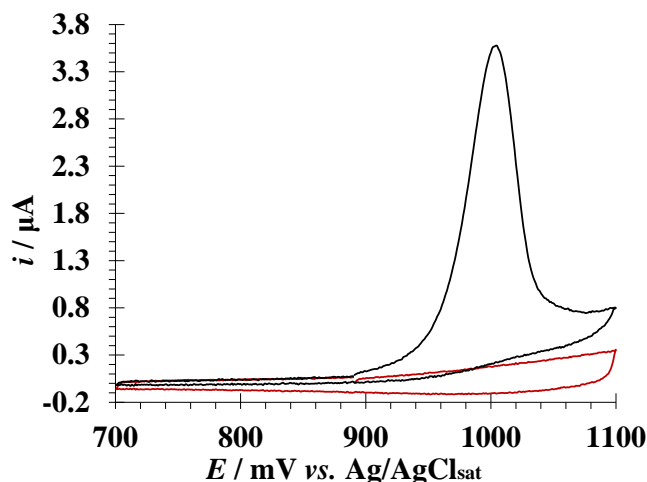
Para llevar a cabo la caracterización electroquímica de CF, se utilizan distintas técnicas electroquímicas como: la voltamperometría cíclica (CV), lineal (LSV), diferencial de pulso (VDP), así como la cronoamperometría, CA, y voltamperometría lineal asistida por disco rotatorio (también llamada simplemente voltamperometría de disco rotatorio), VDR. Una breve explicación de cada técnica puede encontrarse en el Anexo B de este documento.



## 4.3. Resultados

### 4.3.1. Señal electroquímica característica de CF

En la Figura 4.1 son presentados dos voltamperogramas cíclicos, VC, obtenidos a partir de un potencial de inicio,  $E_{in}$ , de 890 mV, a una velocidad de barrido de potencial,  $v$ , de  $20 \text{ mVs}^{-1}$ , así como una ventana de potencial de 700 a 1100 mV. El primer VC, presentado en trazo rojo, es obtenido a partir del sistema EPC/HCl 0.2 M (pH 0.8), en el cual, solo es posible apreciar la corriente capacitiva generada por el medio, mientras que, en el segundo VC presentado en trazo negro obtenido a partir de una solución  $24.44 \mu\text{M}$  CF, se observa claramente una señal asociada a la electrooxidación de CF, localizada en un potencial de pico anódico,  $E_{pa}$ , de 998 mV, sin embargo, al invertir el barrido de potencial no se aprecia señal de reducción asociada, por lo que bajo estas condiciones, la electrooxidación de CF es irreversible. Cabe mencionar, que el intervalo de potencial empleado como ventana de trabajo es establecido con base en un estudio previo realizado en una ventana de -1200 a 1200 mV, en la cual no se encuentran procesos adicionales. Estos resultados, contrastan con lo reportado previamente para CF en HDME, en cuyos VC se observan dos señales de oxidación irreversibles <sup>[31]–[33]</sup>, no obstante, éstas no se asocian a sitios específicos de la estructura molecular de CF, ni tampoco se propone su mecanismo de electrooxidación asociado.



**Figura 4.1** Voltamperogramas cíclicos obtenidos a una  $v$  de  $20 \text{ mV s}^{-1}$  para el sistema EPC/ HCl 0.2 M (pH 0.8), (—), y con  $24.44 \mu\text{M}$  CF (—).



#### 4.3.2. *Proceso de electrooxidación de CF en EPC*

Para lograr discernir la naturaleza de la transferencia másica de CF en el EPC, se lleva a cabo un estudio de velocidad de barrido de potencial,  $v$ , el cual consiste en llevar a cabo una serie de VC en una solución de concentración conocida de CF, incrementando  $v$  para cada uno de los barridos voltamperométricos. De la información obtenida, las corrientes de pico anódico,  $i_{pa}$ , son utilizadas para generar gráficos en función de  $v$ , así como  $v^{1/2}$ , con el propósito observar si el ajuste lineal de los datos satisface lo dispuesto en el modelo de adsorción descrito por la ecuación de Laviron (Ecuación 1), o el modelo de difusión, descrito por la ecuación de Randles-Sevcik (Ecuación 2), respectivamente. Por otro lado, es posible hacer uso de un tercer criterio de identificación <sup>[52]</sup>, que consiste en llevar a cabo la construcción de un gráfico de  $\log i_{pa}$  en función de  $\log v$ , para finalmente efectuar un diagnóstico, basado en el valor de la pendiente obtenida por el ajuste lineal de los datos: un valor de 0.5 proporciona identidad a proceso de naturaleza difusiva, un valor de 1 proporciona identidad a un proceso de naturaleza adsortiva, mientras que valores intermedios proporcionan identidad a procesos mixtos.

$$i_{pa} = \frac{n^2 F^2 \Gamma A v}{4RT}$$

Ecuación 1

Ecuación de Laviron <sup>[18]</sup>.

Donde:

F= constante de Faraday

$\Gamma$ = exceso superficial

A= área del electrodo

T= temperatura

$$i_{pa} = 0.4463 \left( \frac{\alpha F^3}{RT} \right)^{1/2} A n^{3/2} D^{1/2} C_0 v^{1/2}$$

Ecuación 2

Ecuación de Randles-Sevcik <sup>[53]</sup>.

Donde:

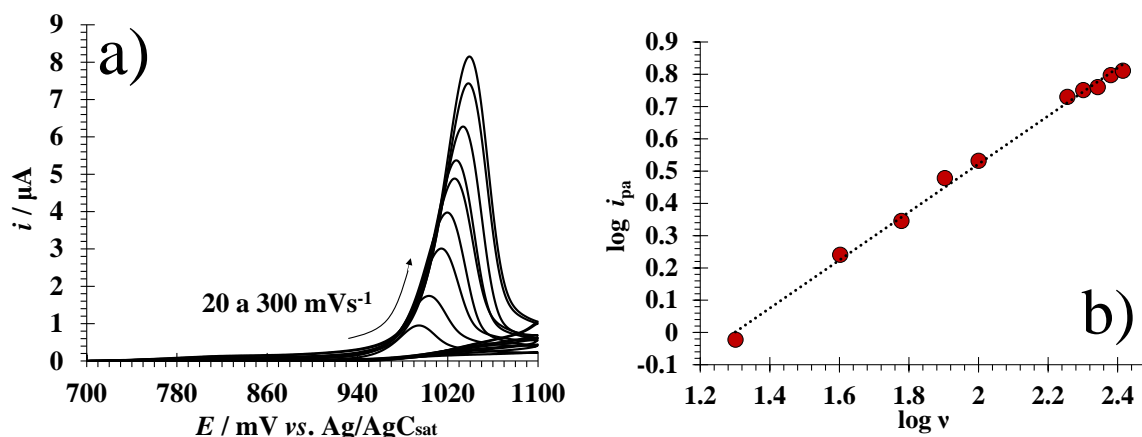
$n$  = número de electrones transferidos

$\alpha$  = coeficiente de transferencia



$S$  = área del electrodo  
 $D$  = coeficiente de difusión de la especie electroactiva  
 $R$  = constante de los gases ideales  
 $v$  = velocidad de barrido de potencial ( $V s^{-1}$ )

La Figura 4.2a, presenta la familia de VC de CF obtenidos del estudio de variación de velocidad de barrido en el sistema EPC/CF 24.44  $\mu M$ , HCl 0.2 M (pH 0.8), a partir de un  $E_{in}$  de 890 mV, en una ventana de potencial de 700 a 1100 mV, así como un intervalo de  $v$  de 20 a 300  $mV \cdot s^{-1}$ . En el gráfico, a una velocidad de barrido de 20  $mVs^{-1}$ , es posible observar que la señal de electrooxidación de CF (inicialmente localizada a un  $E_{pa}$  de 998 mV) aumenta en corriente y potencial a medida que  $v$  se incrementa, al efectuar el ajuste de los datos experimentales por medio de lo dispuesto en los modelos descritos por las ecuaciones 1 y 2, no es claro en cuál de los dos modelos se obtiene el mejor ajuste, ya que los coeficientes de correlación,  $R^2$ , obtenidos son de 0.994 y 0.991, respectivamente. Al emplear el tercer criterio de identificación (Figura 4.2b), se vuelve evidente que la transferencia másica de CF es un proceso mixto (difusión y adsorción), dado por la pendiente de la ecuación  $\log i_{pa} (\mu A) = (0.744 \pm 0.017) \cdot \log v (\mu A) - (0.966 \pm 0.035) (\mu A)$ , con una  $R^2 = 0.995$ , obtenida de la regresión lineal de los datos.



**Figura 4.2.** a) Voltamperogramas cíclicos de CF a diferentes  $v$  del sistema EPC/CF 24.44  $\mu M$ , HCl 0.2 M (pH 0.58),  
b) curva de  $\log i_{pa}$  vs.  $\log v$ .

El conocimiento del número de electrones transferidos,  $n$ , durante la electrooxidación de CF en el EPC es fundamental para caracterizar el sistema electroquímico, es por ello que a continuación se



presenta su determinación a través de dos formas, no obstante, otros parámetros electroquímicos de CF son abordados en la sección 4.3.3.

La determinación de  $n$  en el sistema electroquímico EPC/CF 24.44  $\mu\text{M}$ , HCl 0.2 M (pH 0.8), es conducida a partir del ajuste teórico de los datos experimentales obtenidos del estudio de variación de velocidad, empleando para ello el modelo presentado en la Ecuación 3 <sup>[41]</sup>. Éste modelo, cuenta con la capacidad para ajustar voltamperogramas de procesos electroquímicos en los que el analito se encuentra adsorbido sobre la superficie electródica; atributo con el que cuenta CF y que ha sido discutido previamente.

$$i = \frac{P_1 P_2 \exp[P_3(P_4 - E)]}{\{1 + P_2 \exp[P_3(P_4 - E)]\}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

$P_1 = 4i_p$  ; 4 veces la intensidad de pico anódico

$P_2 = \frac{b_O}{b_R}$  ; Relación de la energía de adsorción de la especie oxidada y reducida

$P_3 = \frac{nF}{RT}$  ; 0.0256/ $n$

$P_4 = E^{0'}$  ; Potencial formal

En Tabla 4.1, se encuentran condensados los valores numéricos obtenidos a partir del ajuste teórico para cada uno de los cuatro parámetros de la Ecuación 3, determinados para un intervalo de  $v$  que va desde 20 hasta 300  $\text{mVs}^{-1}$ , además del valor calculado de  $n$ , derivado del parámetro  $P_4$ . Al analizar los valores numéricos de estos parámetros, es posible observar que el mejor ajuste se obtiene en velocidades bajas, ya que a medida que se incrementa  $v$  también lo hace la incertidumbre ( $\sigma$ ) en cada uno de los mismos, y en particular para el parámetro  $P_2$ , superando inclusive el valor de la media en  $v$  mayores a 120  $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Asimismo, ya que el valor de  $n$  cuenta con poca variación entre velocidades, su aproximación a un valor entero ( $n=2$ ) puede ser efectuado, dando así identidad a un parámetro que hasta el momento no ha sido reportado.



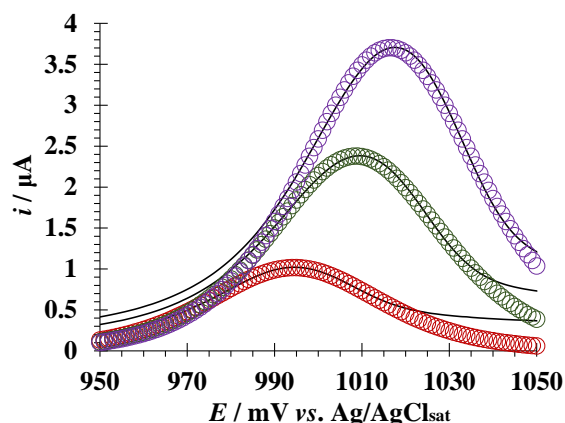
**Tabla 4.1.** Valores determinados con incertidumbre para los cuatro parámetros del modelo de adsorción descrito por la Ecuación 3, así como  $n$  (derivado del parámetro  $P_4$ ), en un intervalo de  $v$  de 20 a 300  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Velocidad de barrido ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$P_1$ ( $\mu\text{A}$ )	$P_2$	$P_3$ ( $\text{V}^{-1}$ )	$P_4$ (V)	$n$
20	$4.06 \pm 0.14$	$0.190 \pm 0.060$	$74.94 \pm 3.44$	$0.8540 \pm 0.0050$	$1.925 \pm 0.089$
40	$7.38 \pm 0.20$	$105.37 \pm 46.37$	$72.12 \pm 2.56$	$0.9490 \pm 0.0040$	$1.853 \pm 0.066$
60	$9.50 \pm 0.42$	$42.31 \pm 27.69$	$75.22 \pm 4.29$	$0.9400 \pm 0.0060$	$1.93 \pm 0.11$
80	$12.86 \pm 0.58$	$42.36 \pm 28.38$	$74.29 \pm 4.27$	$0.94600 \pm 0.0060$	$1.90 \pm 0.11$
100	$14.79 \pm 0.77$	$36.75 \pm 27.81$	$74.25 \pm 4.88$	$0.9470 \pm 0.0070$	$1.90 \pm 0.12$
120	$19.14 \pm 1.20$	$66.14 \pm 63.10$	$73.06 \pm 5.81$	$0.9610 \pm 0.0090$	$1.87 \pm 0.14$
140	$21.50 \pm 1.41$	$109.69 \pm 113.95$	$72.011 \pm 6.083$	$0.9720 \pm 0.0090$	$1.85 \pm 0.15$
160	$17.57 \pm 1.20$	$40.82 \pm 40.98$	$73.90 \pm 6.50$	$0.9510 \pm 0.0090$	$1.89 \pm 0.16$
180	$23.45 \pm 1.56$	$121.29 \pm 125.77$	$74.60 \pm 6.30$	$0.9720 \pm 0.0090$	$1.91 \pm 0.16$
200	$24.83 \pm 1.64$	$53.58 \pm 52.84$	$73.04 \pm 6.21$	$0.9660 \pm 0.0090$	$1.84 \pm 0.17$
220	$25.81 \pm 1.84$	$64.38 \pm 70.24$	$71.98 \pm 6.59$	$0.970 \pm 0.010$	$1.84 \pm 0.17$
240	$28.05 \pm 2.13$	$94.45 \pm 111.51$	$72.78 \pm 7.13$	$0.977 \pm 0.010$	$1.86 \pm 0.18$
260	$29.18 \pm 2.30$	$123.449 \pm 155.051$	$71.98 \pm 7.40$	$0.983 \pm 0.011$	$1.84 \pm 0.19$
280	$32.81 \pm 2.42$	$36.42 \pm 39.80$	$70.66 \pm 6.81$	$0.970 \pm 0.011$	$1.81 \pm 0.17$
300	$35.86 \pm 2.65$	$29.65 \pm 31.96$	$70.56 \pm 6.81$	$0.968 \pm 0.011$	$1.81 \pm 0.17$

Para evaluar de manera gráfica la calidad del ajuste realizado, zonas anódicas voltamperométricas son emuladas a tres diferentes  $v$ : 100, 200 y 300  $\text{mVs}^{-1}$ , y finalmente son comparados en la Figura 4.3 con sus homólogos experimentales. En dicha comparación, es notable el hecho de que los fragmentos voltamperométricos experimentales son reproducidos con buena precisión en los picos, sin embargo, en la base de los mismos es posible advertir un desfase, debido a que el modelo empleado utilizado no toma en consideración la contribución de la corriente capacitiva por parte del electrolito soporte.







**Figura 4.3** Comparación de las zonas anódicas en voltamperogramas teóricos (O) y experimentales (—), obtenidos del sistema EPC/CF 24.44  $\mu\text{M}$ , HCl 0.2 M (pH 0.58) a diferentes  $v$ : 100 (●), 200 (●) y 300 (●)  $\text{mVs}^{-1}$ .

Además del modelado teórico anteriormente presentado, una metodología como la propuesta por Parry y Osteryoung, así como Brett y Brett <sup>[54]</sup> <sup>[55]</sup>, puede ser empleada para llevar a cabo la corroboración del valor de  $n$ . Esta metodología es conducida a través del empleo de la VDP, técnica en la cual la contribución de la corriente capacitiva generada por el electrolito soporte es minimizada, dejando solamente la contribución correspondiente al analito, y con la cual, el valor de  $n$  puede ser convenientemente estimado a partir de la Ecuación 4, utilizando la diferencia de potencial a la altura media del pico anódico estimada de un voltamperograma diferencial de pulso, VDP.

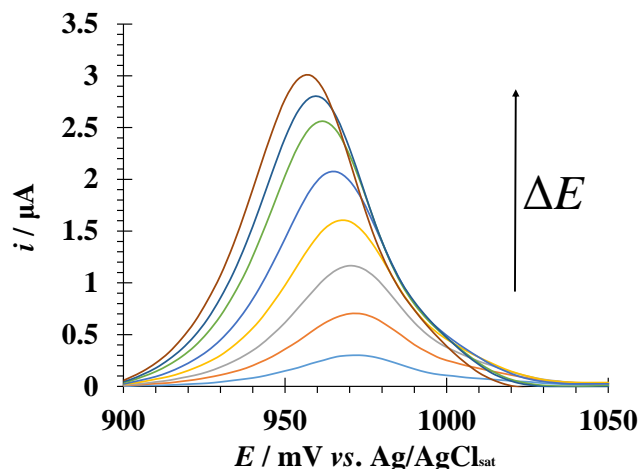
$$W_{1/2} = \frac{3.5nF}{RT} \quad \text{Ecuación 4}$$

Ecuación de que describe en un VDP la relación de la diferencia de potencial a la altura media de pico anódico,  $W_{1/2}$ , con el número de electrones transferidos <sup>[54]</sup>.

En la Figura 4.4 se presenta una familia de VDP, conducidos en el sistema EPC/CF 24.44  $\mu\text{M}$ , HCl 0.2 M (pH 0.58). Cada VDP de la familia, es llevado a cabo empleando para ello una diferente amplitud de pulso,  $\Delta E$ , en un intervalo que va desde 5 hasta 40 mV, debido a que para tener certeza del valor calculado de  $n$ , su valor debe ser consistente en el intervalo de amplitudes de pulso. En la Tabla 4.2, se presenta, para cada VDP el valor estimado de la diferencia de potencial a la altura media de pico,  $W_{1/2}$ , así como del valor estimado de  $n$ , de los cuales es posible advertir que el valor



de  $W_{1/2}$  es consistente, por lo que su valor puede ser aproximado a  $n = 2$ , corroborando así el valor obtenido por medio del modelo de adsorción anteriormente discutido.



**Figura 4.4.** Voltamperogramas diferenciales de pulso del sistema EPC/CF (24.44  $\mu\text{M}$ ), HCl (0.2 M), pH (0.8), obtenidos en un intervalo de amplitudes de pulso de 5 a 40 mV.

**Tabla 4.2** Diferencia de potencial a la altura media de pico anódico y el número de electrones transferidos por CF, obtenidos de las VDP realizadas a diferentes amplitudes de pulso.

$\Delta E / \text{mV}$	$W_{1/2} / \text{mV}$	$n$
5	42.180	$2.1320 \pm 0.0080$
10	43.460	$2.0690 \pm 0.0070$
15	42.290	$2.1270 \pm 0.0080$
20	42.660	$2.1080 \pm 0.0070$
25	41.940	$2.1440 \pm 0.0080$
30	41.280	$2.1780 \pm 0.0080$
35	42.010	$2.1410 \pm 0.0080$
40	41.540	$2.1650 \pm 0.0080$

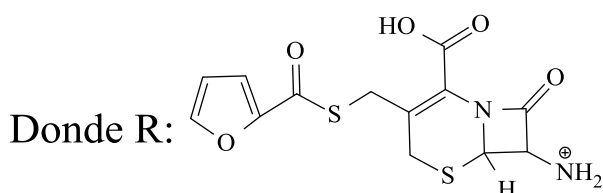
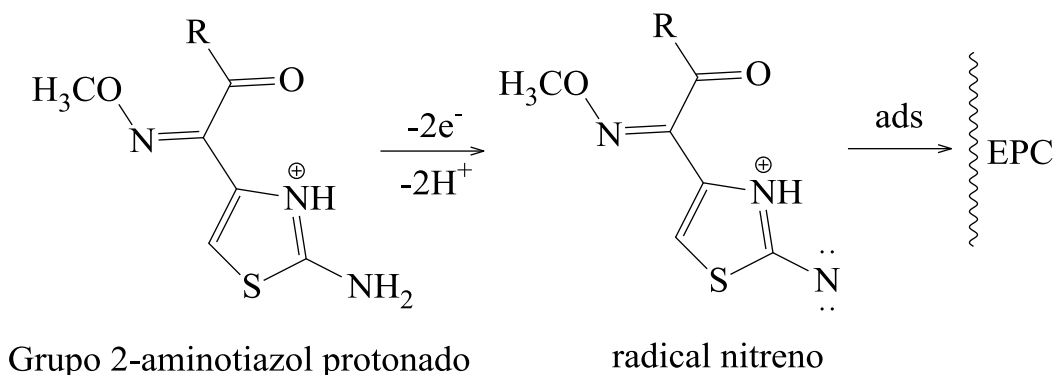
El comportamiento de las cefalosporinas en general es complejo, puesto que diversos autores han estudiado la susceptibilidad de las mismas a la oxidación y la reducción por vía electroquímica, así como teórica, encontrando evidencia de que estos procesos son llevados a cabo por medio de una transferencia másica ambivalente, no obstante, esta información puede ser de utilidad para



proponer un mecanismo de electrooxidación, que permita explicar el comportamiento y la transferencia electrónica de CF.

En la literatura, se han reportado que las diferencias más notables en cuanto al comportamiento electroquímico de las cefalosporinas son debidas a la naturaleza de los grupos funcionales anclados al grupo funcional 7-ACA en R1 y R2 <sup>[56]–[58]</sup>, siendo los sustituyentes de menor polaridad los que tienden a favorecer procesos controlados por la difusión <sup>[59], [60]</sup>, mientras que grupos polares, (como es el caso del grupo funcional iminometoxi) tienden a favorecer procesos controlados por la adsorción <sup>[56], [60], [61]</sup>. CF, así como algunas de las cefalosporinas de mayor comercialización para consumo humano como la Ceftriaxona y la Cefotaxima cuentan con un grupo funcional iminometoxi, por lo que este grupo cuenta con varios estudios previos, en los que se ha encontrado que, tanto en la reducción como en la oxidación, este grupo juega un rol fundamental <sup>[56], [61]</sup>. En particular, para la oxidación del grupo iminometoxi existen diversas opiniones en cuanto al sitio encargado de efectuar la transferencia electrónica, no obstante, la evidencia experimental, así como teórica ha revelado que el sitio de mayor susceptibilidad a la oxidación es la amina aromática primaria del grupo 2-aminotiazol <sup>[60], [62]–[64]</sup>. El mecanismo global de este proceso aplicado a la molécula de CF, se presenta de manera esquemática en la Figura 4.5, en el cual se observa la oxidación de la amina mencionada, generando en consecuencia un radical nitreno, que en un segundo paso podría interaccionar químicamente con el EPC adsorbiéndose a éste fuertemente. Cabe mencionar, que esta última aseveración está fundamentada con lo observado en un análisis adicional del pico de oxidación mediante ciclos voltamperométricos consecutivos, en el cual, con cada ciclo efectuado se aprecia su desvanecimiento gradual, así como un desplazamiento del  $E_{pa}$  asociado hacia valores más positivos, lo cual indica la existencia de una reacción química acoplada que pasiva al electrodo de manera paulatina.





**Figura 4.5.** Mecanismo electroquímico-químico (EC) de electrooxidación propuesto para CF.

Con el objetivo de reafirmar la evidencia experimental obtenida del estudio de variación de velocidad, así como el mecanismo de electrooxidación propuesto para CF, se conduce un estudio por VDR en el sistema EPC/CF 24.44  $\mu\text{M}$ , HCl 0.2 M (pH 0.58), ya que a través de su uso, es posible obtener información del proceso de transferencia másica de CF bajo un régimen hidrodinámico, que provea además información de la cinética de electrooxidación del analito, de por medio de lo establecido por los modelos de Levich y Koutecký-Levich (Ecuaciones 5 y 6).

$$i_{l,dif} = 0.620nFAD^{3/2}\omega^{1/2}$$

**Ecuación 5**

Ecuación de Levich para sistemas difusivos  
bajo un régimen de convección forzada <sup>[65]</sup>.

Donde:

$i_{l,dif}$  = corriente límite por transferencia másica al electrodo  
 $n$  = número de electrones transferidos  
 $F$  = constante de Faraday  
 $A$  = área del electrodo  
 $D$  = coeficiente de difusión de la especie electroactiva  
 $\omega$  = velocidad de rotación



$$\frac{1}{i} = \frac{1}{i_K} + \frac{1}{i_{l,dif}} = \frac{1}{i_K} + \frac{1}{0.620nFAD^{3/2}\omega^{1/2}}$$

**Ecuación 6**

Ecuación de Koutecký-Levich para sistemas difusivos  
bajo un régimen de convección forzada <sup>[53], [65]</sup>.

Donde:

$i$  = corriente controlada por efecto de la transferencia másica

$i_K$  = corriente controlada por efecto de la cinética del sistema

$i_{l,dif}$  = corriente límite difusional por transferencia másica al electrodo

$n$  = número de electrones transferidos

$F$  = constante de Faraday

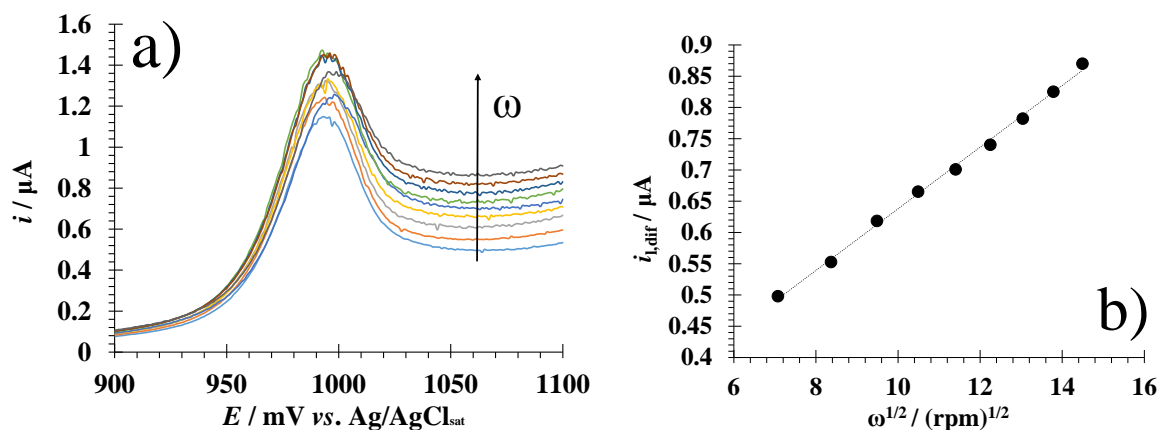
$A$  = área del electrodo

$D$  = coeficiente de difusión de la especie electroactiva

$\omega$  = velocidad de rotación

Los voltamperogramas de disco rotatorio, VDR, presentados en la Figura 4.6a, son obtenidos a partir de un barrido anódico de potencial, desde 900 hasta 1100 mV, a una  $v$  de 20 mVs<sup>-1</sup>, así como un intervalo de velocidades de rotación,  $\omega$ , de 50 a 210 rpm. Al analizar el conjunto de VDR obtenidos, es evidente la ausencia del perfil sigmoideo esperado para sistemas regidos por un comportamiento puramente difusivo <sup>[65]</sup>, debido a la presencia de un proceso adicional alrededor de 1000 mV (apreciable como un pico de corriente), probablemente inducido por la electrooxidación de las especies adsorbidas de CF en el EPC; no obstante, a pesar de ello, el sistema alcanza una corriente límite difusional  $i_{l,dif}$  situada en 1071 mV (indicada con flecha negra, justo antes del aumento de corriente debida a la evolución de oxígeno), que al ser graficada en función de la raíz cuadrada de  $\omega$  (Figura 4.6b), hace perceptible una tendencia lineal descrita por la ecuación  $i_{l,dif} (\mu A) = (0.0493 \pm 0.001)\omega^{1/2} (\mu A) + (0.1452 \pm 0.011) (\mu A)$ ,  $R^2 = 0.997$ , indicando que al ser minimizada la contribución adsorptiva de CF por medio de la rotación, el sistema puede alcanzar un control difusivo, pero de cinética lenta <sup>[65]</sup>, aseveración dada por la ordenada al origen y que será discutida más adelante a través del cálculo de la constante heterogénea de transferencia de carga y el coeficiente de transferencia.





**Figura 4.6.** a) Voltamperogramas de disco rotatorio obtenidos para un intervalo de  $\omega$  de 50 a 200 rpm. b) tendencia lineal definida por  $i_{L,dif} = f(\omega^{1/2})$ , evaluada en un  $E$  de 1071 mV.

La cronoamperometría, CA, también puede ser empleada como una herramienta de utilidad para obtener información del comportamiento de CF, debido a que su funcionamiento está basado en la generación de corriente, producida a través de la imposición de un potencial por un periodo de tiempo determinado. Para extraer la información del proceso electroquímico, la ecuación de Cottrell (Ecuación 7) <sup>[65]</sup>, es uno de los modelos matemáticos más extensamente utilizados, pues establece la relación fundamental entre el tiempo del pulso y la corriente generada debida a éste.

$$i(t) = i_d = \frac{nFAD^{1/2}C_0}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

**Ecuación 7**

Ecuación de Cottrell <sup>[28]</sup>.

Donde:

$i_d$  = corriente límite difusional  
 $n$  = número de electrones transferidos  
 $F$  = constante de Faraday  
 $A$  = área del electrodo  
 $D$  = coeficiente de difusión de la especie electroactiva  
 $t$  = tiempo de aplicación del pulso de potencial

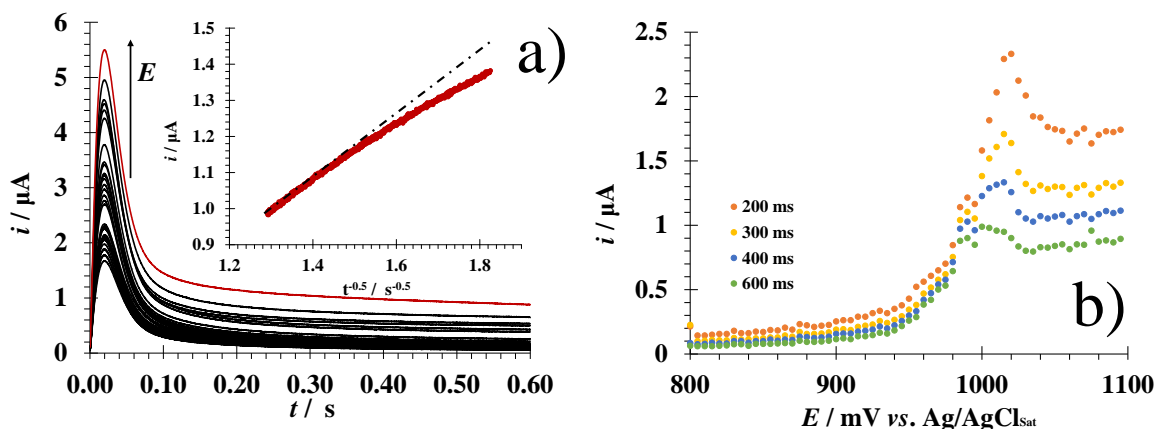
El estudio cronoamperométrico se conduce en el sistema EPC/CF 24.44  $\mu$ M, HCl 0.2 M (pH 0.58), mediante la imposición de pulsos individuales de potencial en un intervalo de 800 a 1100 mV,



durante un periodo de 600 ms. Los CA (también conocidos como transitorios potenciostáticos) obtenidos del estudio cronoamperométrico, son presentados en la Figura 4.7a, en los cuales es posible observar “picos” de corriente a un tiempo de 20 ms, cuyos máximos aumentan a medida que el pulso impuesto se vuelve más positivo. Por otra parte, es posible apreciar que tanto la posición, como la forma de estos picos presentan independencia con respecto al  $E$  aplicado, por lo que es posible asociar a este proceso con la electrooxidación de las especies adsorbidas de CF ( $H_3CF$ ) sobre la superficie del EPC. Posterior a esta señal debida a la adsorción de CF, el sistema alcanza una corriente de carácter límite, sin embargo, al llevar a cabo un análisis por medio de los dispuesto en la ecuación de Cottrell para el transitorio generado a partir de un pulso de 1000 mV y un intervalo tiempo de 300 a 600 ms (inserto de la Figura 4.7a), es posible advertir claramente la carencia de linealidad del sistema, por lo que aún en esta zona del CA la adsorción de CF genera una contribución importante que refuerza aún más la evidencia encontrada con respecto al transporte másico mixto de CF.

A través del tratamiento de los CA obtenidos, es posible construir curvas denominadas como voltamperogramas de corriente muestreada, VCM, cuya elaboración se logra a partir de una serie de transitorios potenciostáticos, muestreando corrientes asociadas a valores de tiempo específicos, y graficando éstas en función del potencial impuesto. La Figura 4.7b esboza los VCM obtenidos para valores de tiempo de 200, 300, 400 y 600 ms, así como un intervalo de potencial de 800 a 1100 mV. En ellos es posible observar un pico voltamperométrico de forma irregular alrededor de 1000 mV, que evoca sutilmente los resultados obtenidos mediante VDR, sin embargo, a diferencia de estos últimos, los picos de corriente observados parecen ser dependientes del tiempo de aplicación del pulso, ya que a mayor tiempo estos tienden “desaparecer” gradualmente, haciendo evidente una la tendencia por parte del sistema hacia un comportamiento puramente difusivo, en el cual sólo podría distinguirse un perfil sigmoide, no obstante, es difícil saber si la pasivación del electrodo (discutida anteriormente) influye en esta tendencia y en qué grado.





**Figura 4.7.** a) Transitorios potenciostáticos del sistema EPC/CF 24.44  $\mu\text{M}$ , HCl 0.2 M (pH 0.58) en un intervalo de 800 a 1100 mV, así como un periodo de 0.6 s. El inserto de la figura muestra una curva  $i=f(t^{-0.5})$   
b) curva de  $i$  en función del potencial aplicado a 200 (○), 300 (○), 400 (○) y 600 (○) ms.

#### 4.3.3. Determinación de parámetros electroquímicos de CF

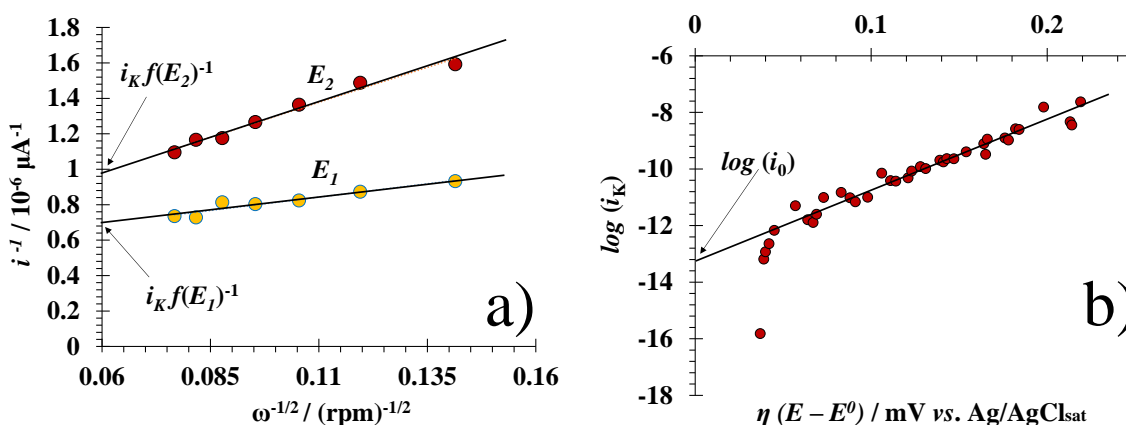
La determinación de parámetros electroquímicos es una labor fundamental para realizar una descripción más precisa del comportamiento del analito; y en particular, el conocimiento de  $n$ , previamente determinado, permite conducir el cálculo de otros parámetros electroquímicos de importancia que hasta el momento no han sido reportados, por medio de a través de aproximaciones derivadas de los modelos matemáticos anteriormente citados en este capítulo, aun cuando el sistema electroquímico en torno a la electrooxidación de CF es complejo.

A través del empleo de lo dispuesto en la ecuación de Koutecký-Levich (Ecuación 6), es posible llevar a cabo un análisis del sistema por medio de información independiente de su complejo transporte de másico, ésto a través de la corriente obtenida en ausencia de transferencia másica,  $i_K$ , parámetro de importancia, pues en consecuencia se posibilita la determinación de parámetros como la constante de velocidad heterogénea de transferencia de carga,  $k^0$ , y el coeficiente de transferencia  $\alpha$ . Para la determinación de  $i_K$ , es necesario efectuar el análisis de Koutecký-Levich para los voltamperogramas obtenidos de la VDR, siguiendo la metodología detallada en <sup>[65]</sup>, para una serie de transitorios en un intervalo de  $E$  y  $\omega$  de 890 a 1100 mV, así como 50 a 210 rpm, respectivamente. En este análisis consiste en graficar  $i^{-1}$  en función de  $\omega^{-1/2}$  para cada  $E$  (Figura 4.8a); en donde la ordenada al origen de la regresión lineal de los datos corresponde a  $i_K^{-1}$ . Ya que el valor obtenido





de  $i_K$  para cada potencial representa la corriente en ausencia de transferencia másica, es posible realizar un análisis *tipo Tafel*, graficando el conjunto logaritmos de  $i_K(E)$  en función del sobrepotencial,  $\eta$ , donde el  $E^0$  es obtenido a partir del ajuste conducido para la Ecuación 3 a una  $v$  de  $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Del gráfico generado (Figura 4.8b), es posible advertir un intervalo de datos que cuenta con una tendencia lineal, de la es posible obtener una regresión lineal cuya ordenada al origen representa el logaritmo de la corriente de intercambio,  $i_0$  ( $\log(i_0) = -13.107$ ), dando lugar a un valor de  $i_0$  de  $2.054 \times 10^{-6} \text{ A}$  ( $\Delta G^0 = -164.797 \text{ kJ/mol}$ ), identidad de la corriente mínima necesaria para llevar a cabo la electrooxidación de CF.



**Figura 4.8.** a) Ejemplificación del gráfico de Koutecký-Levich generado a partir de los VDR del sistema EPC/CF  $24.44 \mu\text{M}$ , HCl  $0.2 \text{ M}$  (pH 0.8), empleando lo dispuesto en la **Ecuación 6** <sup>[65]</sup>, para dos potenciales:  $E_1 = 1000$  y  $E_2 = 1020 \text{ mV}$ . b) curva *tipo Tafel* generada a partir de las corrientes  $i_{Ki} = f(E_i)$ .

Empleando  $i_0$ , y utilizando su relación con  $k^0$  dada por la Ecuación 8, es posible determinar el segundo, obteniendo un valor de  $1.238 \times 10^{-8} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , el cual es termodinámicamente asociado a sistemas de cinética totalmente irreversible <sup>[66]</sup>, soportando así el mecanismo de electrooxidación propuesto anteriormente en la sección 4.3.2.

$$i_0 = k^0 F A C_0$$

Ecuación 8

Relación entre la constante de velocidad heterogénea de transferencia de carga y la corriente de intercambio <sup>[65]</sup>.

Donde:

$i_0$  = corriente de intercambio

$k^0$  = constante heterogénea de transferencia de carga



F = constante de Faraday

A= área del electrodo

C<sub>0</sub> = concentración del analito en el seno de la solución

La posibilidad de llevar a cabo la determinación del coeficiente de transferencia anódico,  $\alpha_a$ , está dada por la relación de la pendiente de la curva *tipo Tafel* generada, siguiendo la consideración descrita por la Ecuación 9 para la región anódica, proporcionando un valor de  $\alpha_a=0.623$ , valor que se encuentra muy cercano al encontrado para el Cefazolin (0.7) y la Ceftriaxona (0.64), debido a la fuerte interacción entre sus sustituyentes y los electrodos empleados en su determinación (HDME y grafito, respectivamente) <sup>[67], [68]</sup>.

$$\alpha_a = \frac{RT}{F} \left( \frac{d \log i}{d \eta} \right)$$

Ecuación 9

Relación entre el coeficiente de transferencia de carga y la pendiente de la curva *tipo Tafel* (IUPAC) <sup>[69]</sup>.

Donde:

$\alpha_a$  = coeficiente de transferencia de carga anódico

F = constante de Faraday

R = constante de los gases ideales

T = temperatura absoluta en condiciones STP

$d \log(i)$  = intervalo de  $\log(i)$  en la zona lineal de la curva Tafel

$d \eta$  = intervalo de  $\eta$  aplicado en la zona lineal de la curva Tafel

Una vez que el coeficiente de transferencia ha sido determinado,  $D$  puede ser convenientemente estimado a través de la ecuación de Randles-Sevcik modificada para sistemas irreversibles, descrita previamente en la Ecuación 2. Del tratamiento de datos conducido a partir del estudio de velocidad, del cual que se obtiene la ecuación  $i_{pa} (\mu A) = (1.420 \pm 0.080) \times 10^{-5} \cdot v^{1/2} (\mu A) - (1.10 \pm 0.20) \times 10^{-6} (\mu A)$ ,  $R^2 = 0.991$ , y empleando un área de electrodo de  $0.07 \text{ cm}^2$  <sup>[30]</sup>, el valor obtenido para  $D$  es de  $8.669 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , valor que se sitúa cercano al reportado para otras cefalosporinas y que se presenta en la Tabla 4.3, lo cual indica además, que los parámetros electroquímicos reportados cuentan con una muy buena aproximación.

**Tabla 4.3** Coeficientes de difusión reportados para diferentes cefalosporinas y en varios electrolitos soporte



Cefalosporina	Electrolito soporte utilizado	Electrodo / Método	pH	Coefficiente de difusión, D
				$10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
<b>Cefsulodin</b> <sup>[70]</sup>	Buffer de fosfatos	Microelectrodos de fibra de carbono	7.4	3.60
<b>Ceftriaxona</b> <sup>[58], [68]</sup>	Ácido bórico, cítrico y ortofosfato trisódico	HDME	2.0	5.36, 2.30
<b>Cefepima</b> * <sup>[71]</sup>	Buffer Britton Robinson	HDME	2.0	7.70
<b>Cefalosporina C</b> <sup>[72]</sup>	Buffer de fosfatos	HPLC	2.8	4.00
<b>Ceftizidima</b> <sup>[58]</sup>	Ácido bórico, cítrico y ortofosfato trisódico	HDME	2.0	6.84
<b>Ceftiozoxima</b> <sup>[58]</sup>	Ácido bórico, cítrico y ortofosfato trisódico	HDME	2.0	6.32

\* Cefalosporina de mayor similitud estructural con Ceftiofur.

Por otro lado, a partir tratamiento de datos del estudio de velocidad empleando el modelo de Laviron (Ecuación 3), por medio del cual se obtiene la ecuación  $i_{pa} (\mu\text{A}) = (3.19 \pm 0.12) \times 10^{-5} \cdot v^{1/2} (\mu\text{A}) - (3.59 \pm 0.97) \times 10^{-7} (\mu\text{A})$ ,  $R^2 = 0.994$ , es posible llevar a cabo la determinación del exceso superficial ( $\Gamma$ ) de CF en el EPC, cuyo valor es de  $1.92 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$  o bien,  $27.076 \times 10^{12}$  moléculas de CF por  $\text{cm}^2$ .

## 4.4. Conclusiones

A través de la caracterización presentada en este capítulo, por primera vez es posible entender la complejidad del mecanismo de electrooxidación que experimenta CF en un EPC. Esta complejidad,



no sólo recae estructural de la molécula, sino también en su transporte másico de carácter mixto, observado a través de distintos métodos, que además permiten conocer parámetros electroquímicos asociados a información cinética, así como de transporte de masa y carga que nunca antes habían sido calculados, que sustentan el mecanismo de electrooxidación que ha sido propuesto, y que se encuentra contenido este capítulo.



# Capítulo 5

## Interacción electroquímica de CF y la $\beta$ -CD

### 5.1. Introducción

Como se ha visto en capítulos previos, la complejidad estructural de CF se ve reflejada en macroescala a través de su comportamiento, tanto espectrofotométrico (efectos cromáticos, varios pKa, entre otros) como electroquímicos (electrooxidación irreversible, transferencia másica mixta, entre otros), por lo que para su estudio es preciso tomar en consideración las condiciones experimentales encontradas dentro de los mismos, o emplear agentes complejantes, en búsqueda de volver más estable su comportamiento. En particular, a partir de la evidencia experimental presentada en la subsección 3.3.3, en la cual se halla evidencia que respalda la formación del complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD en solución, es posible presuponer que dicha interacción supramolecular también puede efectuarse en un electrodo de pasta de carbono cuya superficie ha sido modificada con poli- $\beta$ -CD (EPC- $\beta$ -CD); por lo que, tomando como punto de partida esta premisa, así como aquellas referencias literarias que respaldan los beneficios de emplear  $\beta$ -CD para el estudio de analitos orgánicos (sección 1.1), se efectúa la evaluación de la respuesta electroquímica de CF y la  $\beta$ -CD empleando EPC, EPC- $\beta$ -CD, así como distintos electrolitos soporte. Asimismo, se conduce la determinación de CF en EPC- $\beta$ -CD y el cálculo de sus parámetros electroanalíticos asociados, en vías de efectuar la cuantificación de CF en solución y la validación del método electroquímico.

### 5.2. Metodología

#### 5.2.1. Construcción del EPC y el EPC- $\beta$ -CD

El EPC empleado en la determinación de CF es construido por medio de la metodología propuesta por Martínez y col. <sup>[42]</sup>, en la cual se mezcla grafito y aceite mineral en una proporción 1:1, hasta conseguir una pasta de consistencia homogénea. Posteriormente, ésta es introducida en un contenedor plástico, compactándola para evitar la formación de burbujas de aire, y finalmente, es insertado un conector para establecer el contacto eléctrico hacia el potenciostato-galvanostato.



Para la fabricación del EPC- $\beta$ -CD, se llevar a cabo la electropolimerización de la  $\beta$ -CD (poli- $\beta$ -CD) sobre la superficie del EPC, sumergiendo este en una solución 7 mM  $\beta$ -CD en  $\text{HClO}_4$  a pH 0 y a través del empleo de 10 ciclos voltamperométricos, a partir de un  $E_{\text{pa}}$  de 0 mV, una ventana de potencial de -500 a 1500 mV, así como una  $v$  de  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  [27].

### 5.2.2. Montaje de las celdas electroquímicas

Las mediciones electroquímicas son conducidas en una celda típica de tres electrodos con dos variaciones: la primera, empleada para la determinación del complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD, cuenta con un EPC como WE (diámetro interno de  $0.1414 \text{ cm}^2$ ) [46], un electrodo  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$  como RE, así como un alambre de platino como CE; y la segunda, empleada para el estudio redox de CF en un EPC- $\beta$ -CD, cuenta con un EPC modificado con una película electropolimerizada de poli- $\beta$ -CD como WE, así como el RE y CE previamente descritos.

### 5.2.3. Reactivos

Las soluciones utilizadas son preparadas con clorhidrato de CF ( $24.44 \mu\text{M}$  (97.9 %),  $\beta$ -CD (98 %), así como  $\text{HCl}$  0.2 M (37 %), 0.2 M  $\text{HPO}_4$  (98 %), 0.2 M  $\text{HClO}_4$  (98 %) y Metanol, obtenidos de Sigma-Aldrich. Todas las soluciones son preparadas con agua desionizada Tipo I ( $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) obtenida de un desionizador Milli-Q, modelo Integral 5, previamente burbujeadas con  $\text{N}_2$ , así como protegidas de fuentes de luz.

### 5.2.4. Equipamiento

Los estudios electroquímicos se llevan a cabo utilizando un potenciostato-galvanostato Autolab, modelo PGSTAT 100, con el software Nova 2.1 para el control y adquisición de datos, además de una celda termostatada a  $25^\circ\text{C}$ .

### 5.2.5. Determinación del complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD

La determinación del complejo de inclusión en medio acuoso se lleva a cabo a partir del EPC- $\beta$ -CD/ $24.44 \mu\text{M}$  CF, 0.2 M en:  $\text{HCl}$ , a la cual se añaden alícuotas de concentración conocida de una solución de  $\beta$ -CD, abarcando las relaciones molares: 1:1, 1:2... 1:100, realizando para cada adición



una medición voltamperométrica con una ventana de potencial de 700 hasta 1100 mV. Los resultados obtenidos son utilizados para genera una curva de  $i_{pa}$  en función de la relación  $[CF] \cdot [\beta\text{-CD}]^{-1}$  con el objetivo de obtener evidencia experimental que respalde los resultados encontrados por la vía espectrofotométrica. Asimismo, complementariamente se efectúa un ajuste de los datos experimentales por medio del modelo de Gao y col. <sup>[74]</sup>, para la determinación del valor experimental de  $pK_i$ .

### **5.2.6. Estudio del proceso redox de CF empleando EPC- $\beta$ -CD**

El estudio del proceso redox de CF en EPC- $\beta$ -CD es efectuado a través de estudios de variación de velocidad utilizando VC en los sistemas EPC- $\beta$ -CD/ 3.51  $\mu\text{M}$  CF, 0.2 M en: HCl,  $\text{HClO}_4$  y  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Una vez han sido realizados, los datos experimentales son ajustados mediante las ecuaciones de Laviron y Randles-Sevcik para evaluar si existe un cambio en el transporte másico de CF, producto de la modificación superficial del EPC.

## **5.3. Resultados**

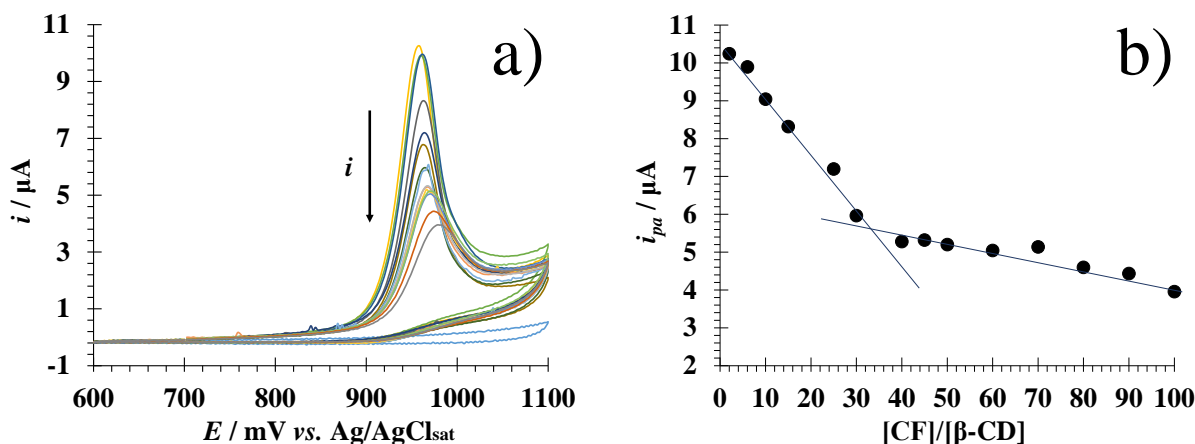
### **5.3.1. Complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD en medio acuoso empleando EPC**

Como se ha visto previamente en el Capítulo 3, la formación del complejo de inclusión debida a la interacción entre CF y la  $\beta$ -CD es posible (vista a través de espectrofotometría UV-Vis); esta interacción podría ser aprovechada para llevar a cabo la determinación de CF por la vía electroquímica, sin embargo, es preciso llevar a cabo un estudio de complejación para conocer si las técnicas voltamperométricas cuentan con la sensibilidad suficiente como para detectar su presencia o formación.

El estudio de complejación por voltamperometría cíclica es conducido en el sistema EPC/CF 24.44  $\mu\text{M}$ , HCl 0.2 M (pH 0.8),  $x$   $\beta$ -CD, donde  $x$  es una concentración conocida de  $\beta$ -CD en el intervalo 24.44  $\mu\text{M}$  a 2.444 mM, siguiendo para ello la metodología indicada en la subsección 5.2.5. Los VC obtenidos son presentados en la Figura 5.1a; en ellos es posible advertir de manera clara que, a medida que se incrementa la concentración de  $\beta$ -CD en el sistema, la intensidad de corriente asociada al pico anódico que inicialmente se sitúa cercano a 10  $\mu\text{A}$  disminuye, y más aún, el potencial de oxidación también se desplaza a potenciales más positivos, por lo que es probable que



este efecto se deba a una mayor dificultad por parte del electrodo para oxidar al CF que se encuentra incluido dentro de la  $\beta$ -CD. En la Figura 5.1b se presenta la tendencia seguida por la  $i_{pa}$  en función de la relación molar  $[CF] \cdot [\beta\text{-CD}]^{-1}$ , para un intervalo de 1 hasta 100. Es importante notar, que la tendencia obtenida presenta un cambio de pendiente en un valor de 30.42, valor que corresponde a un  $pK_i = 3.120$ , que a su vez que coincide de manera cercana con el valor de  $pK_i = 3.121$  obtenido por la vía espectrofotométrica.



**Figura 5.1.** a) Familia de VC obtenidos del estudio de complejación en el sistema EPC/CF 24.44  $\mu\text{M}$ , HCl 0.2 M (pH 0.8),  $x$   $\beta$ -CD ( $\{x \in \mathbf{R} \mid 24.44 \mu\text{M} \leq x \leq 2.444 \text{ mM}\}$ ). b) Gráfico de la  $i_{pa}=f([CF] \cdot [\beta\text{-CD}]^{-1})$ .

Otro método que permite determinar el valor numérico de la constante de inclusión, consiste en efectuar el ajuste de los datos experimentales por medio del modelo de Gao y col., descrito por la Ecuación 10, el cual reproduce la variación de la corriente de pico en un proceso redox como función de la concentración de  $\beta$ -CD añadida en el sistema.

$$i_p^2 = \frac{K_d}{[\beta - CD]} (i_{p(R)}^2 - i_p^2) + i_{p(R-\beta-CD)}^2 \quad \text{Ecuación 10}$$

Ecuación de Horwitz para la estimación del límite aceptable del coeficiente de variación RSD <sup>[75]</sup>.

Donde:

$i_p$  = pico de corriente observado

$K_d$  = concentración de  $\beta$ -CD en el equilibrio

$[\beta\text{-CD}]$  = concentración de  $\beta$ -CD en el sistema

$i_p^2$  = corriente de pico anódico de CF observada

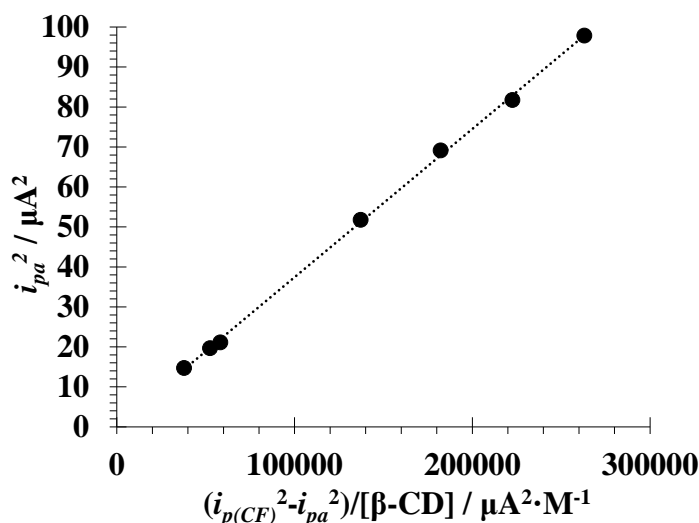
$i_{p(R)}^2 = i_{pa}$  de la especie de CF libre (sin complejar)





$$i_{p(R-\beta-CD)}^2 = i_{pa} \text{ de la especie CF-}\beta\text{-CD}$$

El ajuste de los datos experimentales presentados en la Figura 5.1a, permite obtener como resultado la tendencia lineal que se presenta gráficamente en la Figura 5.2, y que está descrita por la ecuación  $i_{pa}^2 (\mu A^2) = (370.810 \pm 4.042) \times 10^{-6} (i_{pa(CF)}^2 - i_{pa}^2) \cdot [\beta\text{-CD}] (\mu A^2 \cdot M^{-1}) + 0.37 \pm 0.65 (\mu A^2)$ , con una coeficiente de correlación de 0.999. El valor obtenido de  $K_d$ , conduce a un valor de  $pK_i (-\log(K_d))$  de 3.43, que resulta cercano a los valores experimentales obtenidos tanto de manera gráfica (Figura 5.1b) como por espectrofotométrica UV-Vis, confirmando con ello que la VC es una técnica sensible al complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD y haciendo plausible del estudio de CF empleando EPC- $\beta$ -CD.



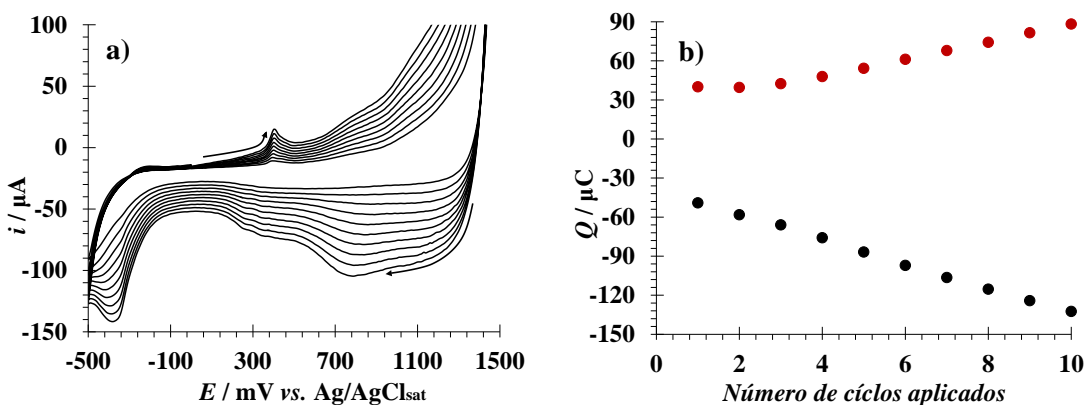
**Figura 5.2.** a) Ajuste de los VC obtenidos del estudio de complejación en el sistema EPC/CF 24.44  $\mu$ M, HCl 0.2 M, con respecto a lo dispuesto por en el modelo de Gao y col. <sup>[74]</sup>

### 5.3.2. Electropolimerización de la $\beta$ -CD sobre EPC para la obtención del EPC- $\beta$ -CD

La modificación del EPC se lleva a cabo a partir de la electropolimerización de la  $\beta$ -CD a través de 10 ciclos voltamperométricos efectuados en el sistema EPC/7 mM  $\beta$ -CD, 1 M  $HClO_4$ , de los que como resultado se obtiene una familia de VC que se presenta en la Figura 5.3a, en la cual es posible observar que la corriente obtenida en cada VC se incrementa con cada ciclo, debido a la formación de una película de poli- $\beta$ -CD en la superficie del EPC. En el gráfico es apreciable un



pico de oxidación situado en un potencial de 366 mV, además de un hombro entre 700 y 1000 mV, que en la literatura son asociados a la presencia de especies adsorbidas por efecto de la interacción con los radicales catiónicos generados en la oxidación de la  $\beta$ -CD [27]. Por otro lado, al determinar la carga para la zona anódica y catódica generada en cada ciclo (Figura 5.3b), es posible apreciar que la carga generada aumenta de manera gradual y prácticamente constante (a partir del segundo ciclo), comportamiento que es esperado en la formación de polímeros conductores y que corrobora el crecimiento de la poli- $\beta$ -CD sobre el EPC.



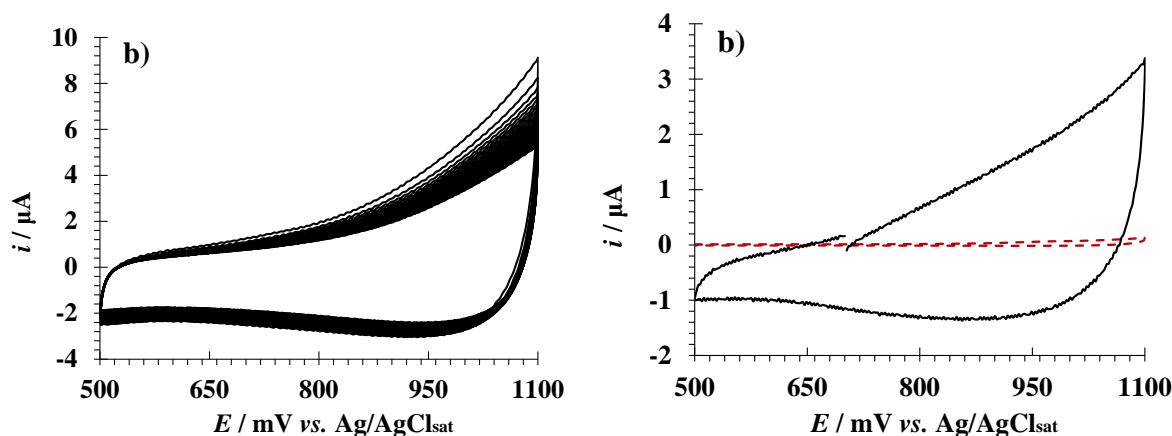
**Figura 5.3.** a) Familia de VC (10 ciclos) realizados en el sistema EPC/7 mM  $\beta$ -CD, 1 M  $\text{HClO}_4$  (pH 0), a  $100 \text{ mVs}^{-1}$   
b) Carga generada en cada ciclo de la electropolimerización de la  $\beta$ -CD en la rama anódica (●) y catódica (●).

### 5.3.3. Naturaleza de la transferencia másica de CF en EPC- $\beta$ -CD

Una vez conducida la electropolimerización de la  $\beta$ -CD sobre la superficie del EPC, el electrodo de trabajo (ahora EPC- $\beta$ -CD) es sometido a un acondicionamiento electroquímico dentro de una solución libre de  $\beta$ -CD, con el propósito de habitar la superficie electródica a los cambios de potencial derivados de las técnicas voltamperométricas, así como favorecer con ello un mejor acomodo de la poli- $\beta$ -CD sobre el EPC. Este acondicionamiento electroquímico se lleva a cabo por medio de la aplicación de 100 VC en el sistema EPC- $\beta$ -CD/0.2 M  $\text{HClO}_4$ , a una  $v$  de  $200 \text{ mVs}^{-1}$  y una ventana de potencial de 500 a 1100 mV (Figura 5.4a), en la cual no es posible observar la presencia de señales redox asociadas; y por otro parte, en la Figura 5.4b se presenta la comparación de dos perfiles voltamperométricos, conducidos en el sistema citado anteriormente, empleando tanto EPC (trazo discontinuo) como EPC- $\beta$ -CD (trazo continuo), a una  $v$  de  $100 \text{ mVs}^{-1}$ , de la cual



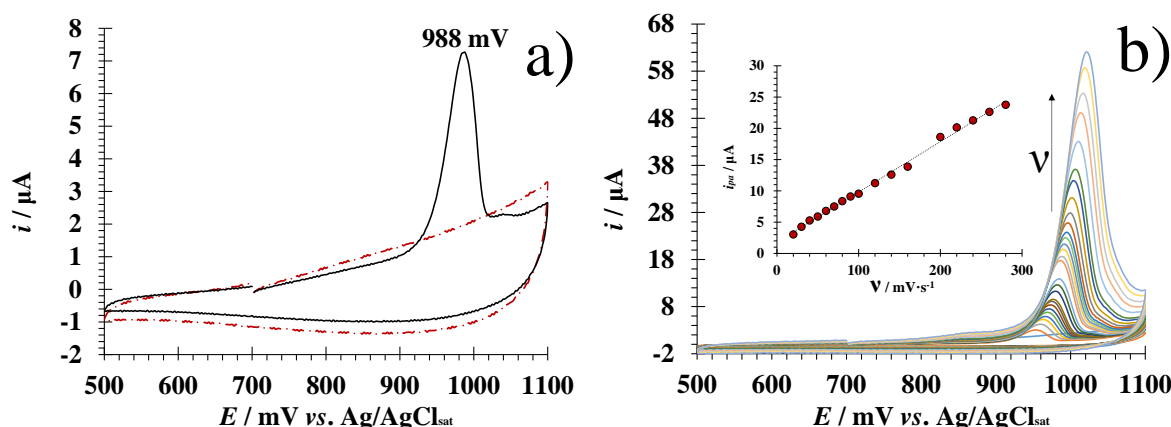
es posible observar el aumento de la corriente capacitiva, producto de la modificación efectuada en el EPC.



**Figura 5.4.** Familia de VC (100 ciclos) realizados a  $200 \text{ mVs}^{-1}$  en el sistema EPC- $\beta$ -CD/ $0.2 \text{ M HClO}_4$  (pH 0.88)  
b) VC obtenidos a partir de EPC (—) y EPC- $\beta$ -CD (—) para el electrolito soporte citado anteriormente.

Derivado de la modificación superficial efectuada en el EPC, es natural presuponer que ésta podría tener un efecto en que el comportamiento de CF, debido a la formación del complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD, es por ello, que para evaluar el efecto de la modificación que el EPC tiene sobre el transporte de masa de CF, un estudio de velocidad es conducido en el sistema EPC- $\beta$ -CD/ $3.51 \mu\text{M}$  CF,  $0.2 \text{ M HClO}_4$ . La familia de VC obtenidos del estudio de velocidad, presentada en la Figura 5.5b, es generada a partir de un intervalo de  $v$  de  $20$  a  $300 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , en la que es posible observar un pico de oxidación, cuya  $i_{pa}$  y  $E_{pa}$  se desplazan a valores más positivos conforme  $v$  se incrementa. Asimismo, para identificar la naturaleza del transporte másico que controla la reacción de electrooxidación de CF en el electrodo, los valores de  $i_{pa}$  son graficados en función de  $v$  y  $v^{1/2}$ , y ajustados con respecto a lo establecido en las ecuaciones 1 (Laviron) y 2 (Randles-Sevcik) [53], [76] y finalmente comparados; encontrando que el mejor ajuste es aquel obtenido por el modelo de Laviron, descrito por la ecuación  $i_{pa} (\text{A}) = (0.0656 \pm 0.001)v (\text{A}) + (1.369 \pm 0.126) (\text{A})$  (inserto de la Figura 5.5b), por lo que, en contraste con lo observado en EPC (donde la electrooxidación de CF es gobernada por un proceso mixto), dicho proceso se ve modificado hacia un comportamiento puramente adsorptivo, favorecido en efecto por la formación del complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD en la interface del electrodo.



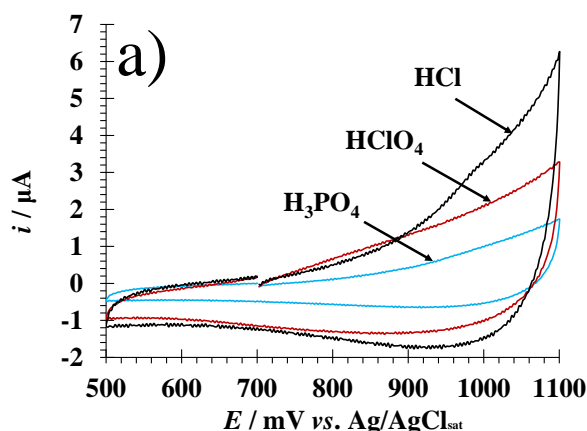


**Figura 5.5.** a) Perfiles voltamperométricos obtenidos del sistema EPC- $\beta$ -CD/0.2 M  $\text{HClO}_4$ , a una  $v$  de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , para CF a una concentración  $3.51 \mu\text{M}$  (—), y el electrolito soporte (---).  
b) Familia de VC del sistema EPC- $\beta$ -CD/3.51  $\mu\text{M}$  CF, 0.2 M  $\text{HClO}_4$ , a diferentes  $v$  en un intervalo de 20 a  $300 \text{ mV}$ . En el inserto se muestra la tendencia lineal obtenida al graficar  $i_{pa} = f(v)$ .

### 5.3.4. Efecto de la modificación del EPC en diferentes solventes

Con el propósito de evaluar el efecto que tiene el electrolito soporte en la señal electroquímica de CF y descartar con ello variaciones en el comportamiento adsorptivo (determinado en la sección anterior), una evaluación voltamperométrica es conducida para dos electrolitos soporte adicionales:  $\text{HCl}$  y  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , de manera similar a la efectuada en  $\text{HClO}_4$  (0.2 M). La comparación de las señales voltamperométricas obtenidas de cada uno de los electrolitos soporte es presentada en la Figura 5.6, en la que es posible observar la carencia de señales redox asociadas, sin embargo, es evidente una variación de la corriente capacitiva, probablemente debida a la doble capa eléctrica generada por cada uno de los conductores iónicos empleados.

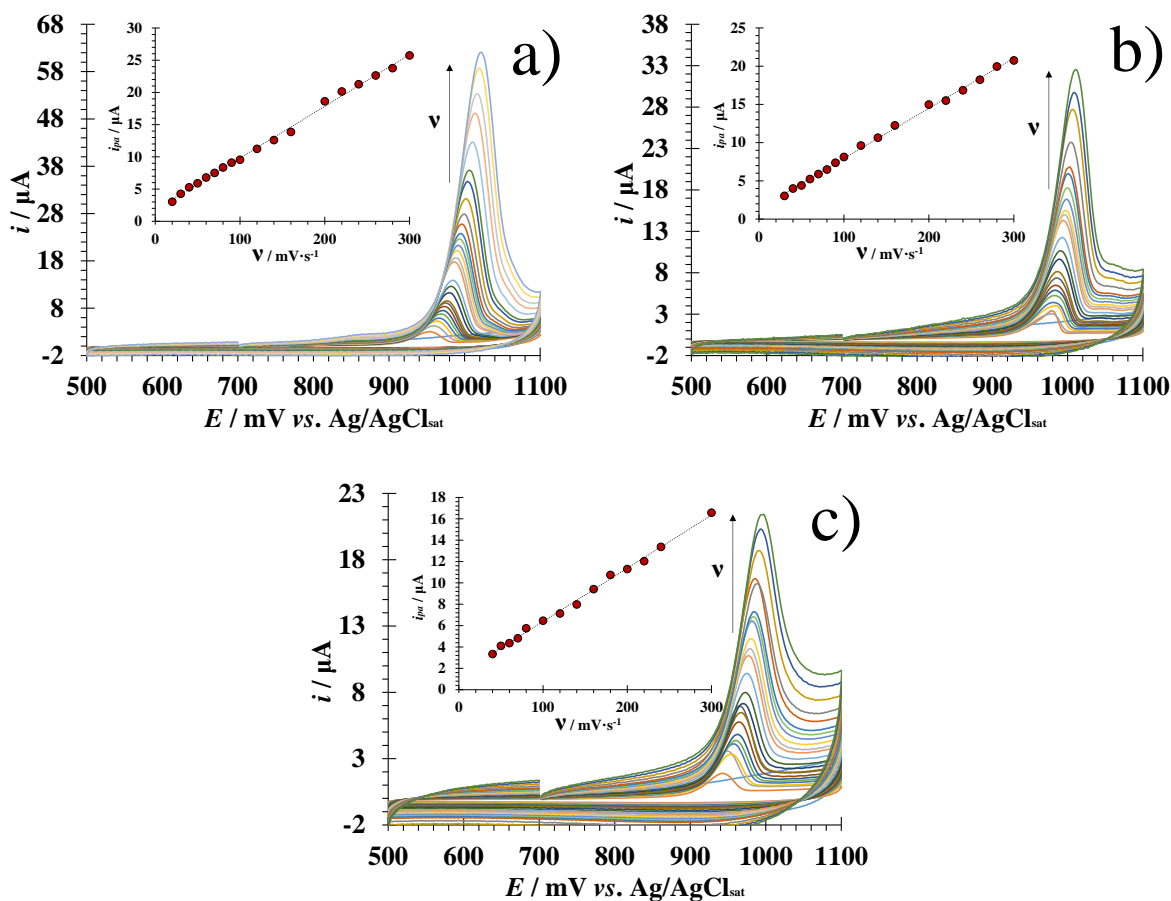




**Figura 5.6.** Perfiles voltamperométricos obtenidos del electrolito soporte en el sistema EPC- $\beta$ -CD/ a) 0.2 M HCl (—), b) 0.2 M HClO<sub>4</sub> (—) y c) 0.2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (—) (pH 0.88), a una  $v$  de 100 mVs<sup>-1</sup>.

Para determinar el transporte másico de CF en los sistemas adicionales (EPC- $\beta$ -CD/ 3.51  $\mu$ M CF, 0.2 M i) HCl y ii) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), un estudio de variación velocidad es conducido para un intervalo de  $v$  de 20 a 300 mV, cuyos VC pueden ser observados en la Figura 5.7a y c, así como comparados con lo obtenido para el primer sistema (Figura 5.7b). De los resultados obtenidos, en primera instancia es notable que el sistema que contribuye con la mayor corriente de respuesta es el de HCl, seguido del HClO<sub>4</sub> y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, además de picos anódicos que son desplazados a potenciales más positivos conforme  $v$  se incrementa. Por otra parte, el diagnóstico efectuado para cada uno de los sistemas, es conducido a través del ajuste de Laviron y Randles-Sevcik, el cual revela que el conjunto de sistemas estudiados posee un comportamiento predominantemente adsorptivo visto a través de las tendencias lineales descritas por las ecuaciones  $i_{pa} (\mu A) = (0.0656 \pm 0.001)v (\mu A) + (1.369 \pm 0.126) (\mu A)$  (HCl),  $i_{pa} (\mu A) = (0.0656 \pm 0.001)v (\mu A) + (1.369 \pm 0.126) (\mu A)$  (HClO<sub>4</sub>) e  $i_{pa} (\mu A) = (0.0656 \pm 0.001)v (\mu A) + (1.369 \pm 0.126) (\mu A)$  (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (insertos de la Figura 5.7a, b y c), por lo que el a raíz de estos resultados, se observa que cambio de electrolito carece de efecto en el transporte de masa de CF, sin embargo, no sucede lo mismo con la magnitud de la corriente obtenida por cada uno de los sistemas, pues ésta al parecer discrepa en función del tamaño del anión del electrolito soporte.





**Figura 5.7.** Familias de VC obtenidos de los sistemas EPC- $\beta$ -CD/ 3.51  $\mu$ M CF, 0.2 M a) HCl, b) HClO<sub>4</sub> y c) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, en una ventana de potencial de 500 a 1100 mV, así como un intervalo de  $v$  de 20 a 300 mV·s<sup>-1</sup>. El inserto de cada gráfico presenta los ajustes de  $i_{pa}=f(v)$  obtenidos.

## 5.4. Conclusión

La evidencia experimental contenida en este capítulo provee información inédita sobre CF y su interacción con la  $\beta$ -CD, que se demuestra la sensibilidad de las técnicas voltamperométricas para detectar la formación del complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD. El estudio de complejación en solución, permitió conocer que la voltamperometría cuenta con una sensibilidad similar a la obtenida por medio de espectrofotometría UV-Vis, al obtener un  $pK_i$  de valor de similar, corroborado mediante un medio gráfico y el modelo de complejación propuesto por Gao y col. Por otro lado, los cambios observados en la respuesta electroquímica de CF a debidos al empleo de EPC modificados son notables: la dependencia de la señal electroquímica de respuesta de CF en función del electrolito



soporte, el cambio en el tipo de transporte de masa que experimenta CF (de uno mixto a uno adsorptivo), así como la capacidad con la que cuentan para efectuar múltiples mediciones voltamperométricas (calidad con la que carece el EPC antes de su modificación), simplificando con ello el sistema electroquímico, reduciendo el tiempo de análisis y minimizando los errores aleatorios debidos a la renovación de la superficie del electrodo.



# Capítulo 6

## Cuantificación de CF en EPC y EPC- $\beta$ -CD

### 6.1. Introducción

Ceftiofur cuenta con efectos positivos en animales, cuya salud se encuentra aquejada por infecciones debidas a ambientes poco salubres y al escaso cuidado proporcionado por parte de los ganaderos. Estos últimos, quienes recurren inclusive a la dosificación de CF como un método de prevención de enfermedades, permiten que sus trazas lleguen a alimentos, que una vez consumidos favorecen la generación de multirresistencia bacteriana a las cefalosporinas, reduciendo gradualmente la eficacia de medicamentos destinados exclusivamente para humanos. Esta es la principal razón por la que la cuantificación de CF se vuelve una labor primordial, que debe ser atendida a través de métodos rápidos y poco costosos que permitan detener de manera efectiva la contaminación de alimentos y la proliferación de entes bacterianos resistentes.

Este capítulo es la culminación del estudio de CF de este documento, pues se presenta su determinación por la vía electroquímica, sus parámetros electroanalíticos asociados y la validación del método con estipulado por organismos nacionales e internacionales.

### 6.2. Metodología

#### 6.2.5. Construcción del EPC y el EPC- $\beta$ -CD

El EPC empleado en la determinación de CF es construido por medio de la metodología propuesta por Martínez y col. <sup>[42]</sup>, en la cual se mezcla grafito y aceite mineral en una proporción 1:1, hasta conseguir una pasta de consistencia homogénea. Posteriormente, ésta es introducida en un contenedor plástico, compactándola para evitar la formación de burbujas de aire, y finalmente, es insertado un conector para establecer el contacto eléctrico hacia el potenciostato-galvanostato.

Para la fabricación del EPC- $\beta$ -CD, se llevar a cabo la electropolimerización de la  $\beta$ -CD (poli- $\beta$ -CD) sobre la superficie del EPC, sumergiendo este en una solución 7 mM  $\beta$ -CD en HClO<sub>4</sub> a pH 0





y a través del empleo de 10 ciclos voltamperométricos, a partir de un  $E_{pa}$  de 0 mV, una ventana de potencial de -500 a 1500 mV, así como una  $v$  de  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  [27].

### **6.2.6. Montaje de las celdas electroquímicas**

Las celdas electroquímicas utilizadas para las determinaciones de CF son celdas típicas de tres electrodos. La primera cuenta con un EPC como WE (diámetro interno de  $0.1414 \text{ cm}^2$ ) [46], un electrodo Ag/AgCl<sub>sat</sub> como RE, así como un alambre de platino como CE; mientras que la segunda cuenta con un EPC modificado con una película de poli- $\beta$ -CD como WE, así como el RE y CE previamente mencionados. Los sistemas son: EPC/  $3.51 \mu\text{M}$  CF,  $0.2 \text{ M}$  HCl y EPC- $\beta$ -CD/  $3.51 \mu\text{M}$  CF,  $0.2 \text{ M}$  en: HCl, HClO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

### **6.2.7. Determinación de CF en EPC y EPC- $\beta$ -CD**

Las determinaciones electroquímicas para cada sistema mencionado se llevan a cabo independientemente por medio de VC y VDP. Una vez montada la celda electroquímica se lleva a cabo la medición de la señal del electrolito soporte; posteriormente se lleva a cabo la adición de alícuotas de concentración conocida de CF dentro de un intervalo de  $0.33$  a  $33.24 \mu\text{M}$ , realizando una medición voltamperométrica para cada una de ellas, a una velocidad de barrido de  $100 \text{ mVs}^{-1}$  en el caso de la VC y  $25 \text{ mV}$  de  $\Delta E$  para la VDP, respectivamente. Posterior a ello, se construye la curva de calibrado respectiva y el cálculo de los parámetros electroanalíticos asociados como la sensibilidad, límites de detección, cuantificación e intervalo de linealidad.

### **6.2.8. Validación del método electroquímico por EPC- $\beta$ -CD**

Para llevar a cabo la validación del método electroquímico se lleva a cabo el seguimiento de las consideraciones en las guías de validación publicadas por la IUPAC (Directrices Armonizadas para la Validación Interna de Métodos de Análisis para la validación de métodos analíticos), SAGARPA (guía para la validación de métodos analíticos cromatográficos para plaguicidas), así como la norma mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 (requisitos para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración).



### 6.2.9. Reactivos

Las soluciones utilizadas son preparadas con clorhidrato de CF (24.44)  $\mu$ M (97.9 %),  $\beta$ -CD (98 %), así como HCl 0.2 M (37 %), 0.2 M HClO<sub>4</sub> (98 %) y Metanol, obtenidos de Sigma-Aldrich. Todas las soluciones son preparadas con agua desionizada Tipo I (18.2 M $\Omega$ •cm<sup>2</sup>) obtenida de un desionizador Milli-Q, modelo Integral 5, previamente burbujeadas con N<sub>2</sub>, así como protegidas de fuentes de luz.

### 6.2.10. Equipamiento

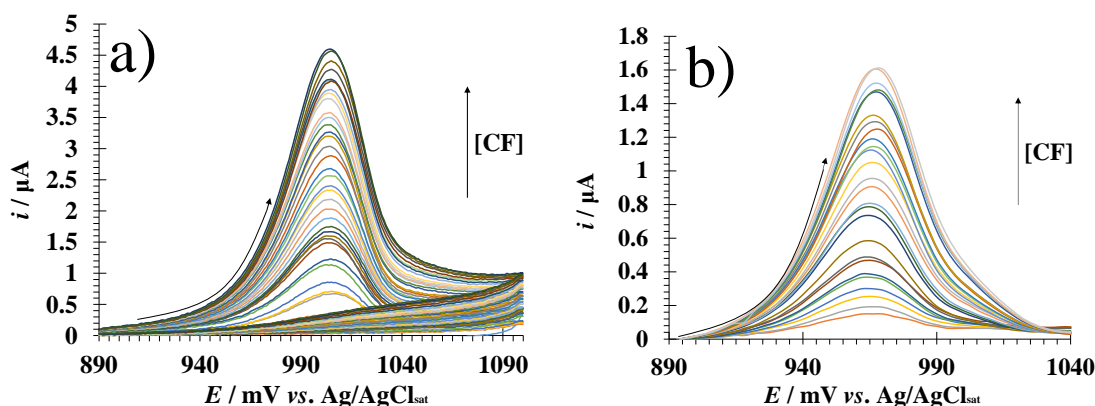
Los estudios electroquímicos se llevan a cabo utilizando un potenciostato-galvanostato Autolab, modelo PGSTAT 100, con el software Nova 2.1 para el control y adquisición de datos, además de una celda termostatada a 25 °C.

## 6.3. Resultados

### 6.3.1. Determinación de CF en EPC

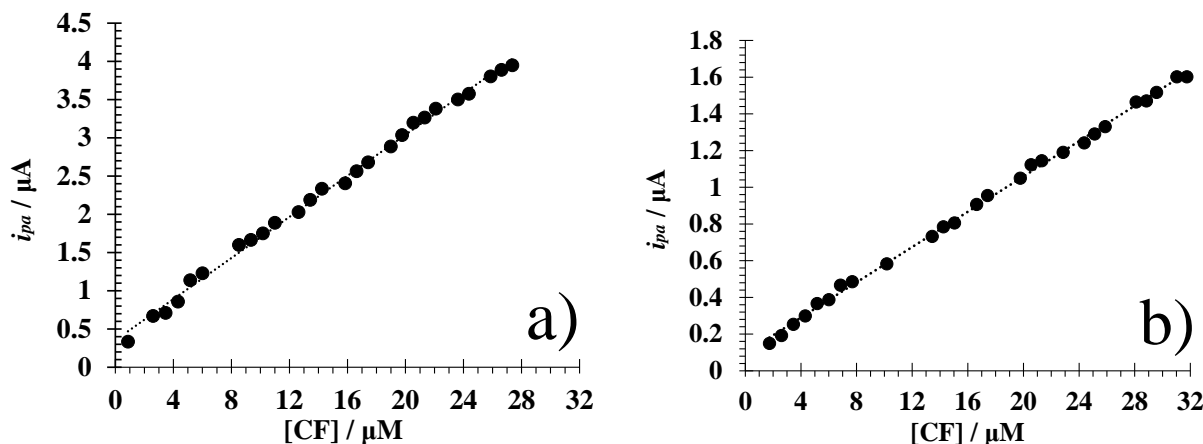
Para poder llevar a cabo la determinación de CF, se realizan experimentos de variación de concentración por medio de VC y VDP, a partir de estos, se construyen curvas de calibrado graficando la  $i_{pa}$  en función de la concentración de CF en el sistema y finalmente, de ésta los parámetros electroanalíticos como son: la sensibilidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) y el intervalo de linealidad. En la Figura 6.1 se presenta la familia de a) VC y b) VDP efectuados en el sistema EPC/ 0.2 M HCl (pH 0.8),  $x$   $\mu$ M CF, donde  $x$  es una concentración variable de CF dentro de un intervalo que va desde 0.871 hasta 36.724  $\mu$ M. A partir de la respuesta electroquímica obtenida por VC, es posible observar un pico anódico localizado en 1005 mV, mientras que por VDP se obtiene pico anódico localizado en 966 mV, en ambos sistemas la corriente se incrementa consistentemente a medida que la concentración de CF en el sistema aumenta.





**Figura 6.1.** a) Familia de VC de CF a  $100 \text{ mVs}^{-1}$ . b) Familia de VDP a  $\Delta E$  de  $20 \text{ mV}$ , ambas técnicas utilizadas en el sistema EPC/CF ( $0.871\text{--}36.724 \text{ } \mu\text{M}$ ), HCl ( $0.2 \text{ M}$ ) pH ( $0.8$ ).

Las curvas de calibrado construidas a partir de estas dos técnicas se presentan en la Figura 6.2, las cuales se encuentran descritas por las ecuaciones:  $i_{pa} (\mu\text{A}) = (1.369 \pm 0.064)[\text{CF}] (\mu\text{A}) + (4.566 \pm 0.391) (\mu\text{A})$  (para VC) e  $i_{pa} (\mu\text{A}) = (1.231 \pm 0.027)[\text{CF}] (\mu\text{A}) + (4.106 \pm 0.166) (\mu\text{A})$  (para VDP). Los parámetros electroanalíticos asociados para cada una de las mismas (sensibilidad, LOD y LOQ, así como el intervalo de linealidad), son obtenidos por medio de lo dispuesto por la IUPAC <sup>[77]</sup> y presentados en la Tabla 6.1. Al hacer una comparación entre los parámetros obtenidos es posible advertir que la VC es la técnica más sensible, sin embargo, la VDP cuenta con LOD y LOQ más bajos, así como un intervalo de linealidad mayor al alcanzado por la VC.



**Figura 6.2.** Tendencia lineal de  $i_{pa}$  en función de la concentración de CF, en el sistema EPC/CF ( $0.871\text{--}36.724 \text{ } \mu\text{M}$ ), HCl ( $0.2 \text{ M}$ ), pH ( $0.8$ ) obtenida por a) VC y b) VDP.



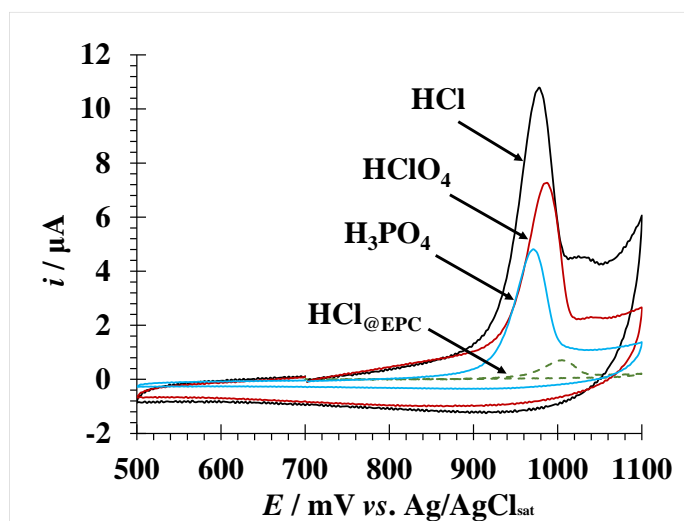
**Tabla 6.1.** Parámetros analíticos obtenidos de las curvas de calibrado de CF.

Técnica	Electrodo	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ )	LOD* ( $\mu\text{M}$ )	LOQ** ( $\mu\text{M}$ )	Intervalo de linealidad ( $\mu\text{M}$ )
VC	EPC	$0.1370 \pm 0.0030$	$1.727 \pm 0.073$	$5.76 \pm 0.13$	$5.76 \pm 0.26$ - $27.36 \pm 1.38$
VDP	EPC	$0.0480 \pm 0.0010$	$1.231 \pm 0.027$	$4.11 \pm 0.17$	$1.74 \pm 0.18$ - $31.75 \pm 0.79$

\*Límite de detección (LOD)= $3\sigma/m$  y \*\*límite de cuantificación (LOQ)=  $10\sigma/m$

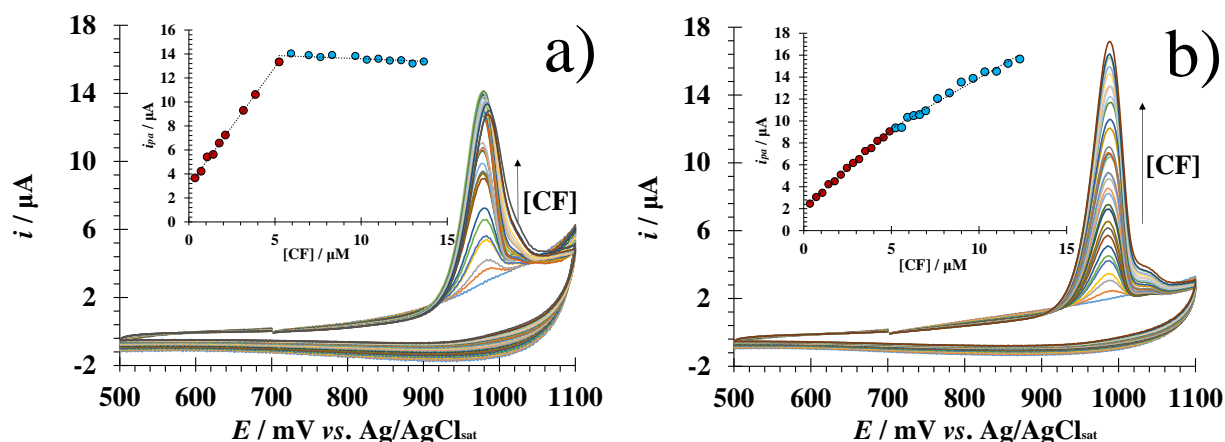
### 6.3.2. Determinación de CF en EPC-β-CD y tres electrolitos soporte distintos por VC

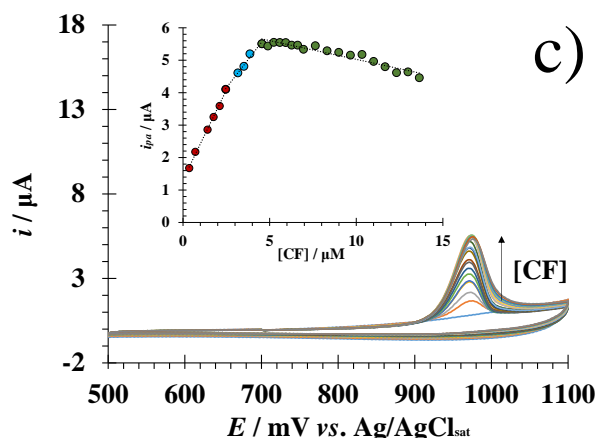
Ya que la evidencia experimental presentada en el Capítulo 5 sugiere que la corriente observada en los VC se encuentra influenciada por el electrolito soporte utilizado, en la Figura 6.3, se muestra la comparación de los perfiles voltamperométricos, obtenidos de los sistemas EPC-β-CD/  $3.51 \mu\text{M}$  CF,  $0.2 \text{ M}$  en:  $\text{HCl}$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , comparados además con el perfil obtenido previamente para el sistema EPC/ $3.51 \mu\text{M}$  CF,  $0.2 \text{ M}$   $\text{HCl}$  (pH 0.88). De esta comparación, es posible advertir que los sistemas EPC-β-CD cuentan con una mayor corriente de respuesta, los picos anódicos se encuentran mejor definidos y localizados a potenciales menos positivos (980, 988 y 975 mV) con respecto al sistema con EPC (998 mV), por lo que de manera general, los electrodos modificados cuentan con una mayor sensibilidad hacia CF debido a la interacción con la poli-β-CD.



**Figura 6.3.** Comparación de la zona anódica de CF, obtenida a partir de VC para los sistemas EPC- $\beta$ -CD/3.51  $\mu$ M CF, 0.2 M HCl (—), 0.2 M HClO<sub>4</sub> (—) y 0.2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (—), comparados con el VC de CF en el sistema EPC/3.51  $\mu$ M CF, 0.2 M HCl (- - -).

Dado que en los perfiles voltamperométricos anteriormente presentados se obtiene una corriente de respuesta distinta en función del electrolito soporte utilizado, la determinación de CF se efectúa en los tres electrolitos, dentro de un intervalo de concentración de 0.354 a 13.640  $\mu$ M CF. De las familias voltamperométricas obtenidas, presentadas en la Figura 6.4, es posible observar una diferencia en la corriente de respuesta en función del electrolito soporte utilizado. Los insertos presentados, muestran la dependencia de la  $i_{pa}$  en función de la concentración de CF para todo el intervalo de concentración utilizado, en estos, además, es posible observar cambios de pendiente, particularmente dos en el caso de HCl, dos en HClO<sub>4</sub> y tres en el caso del H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

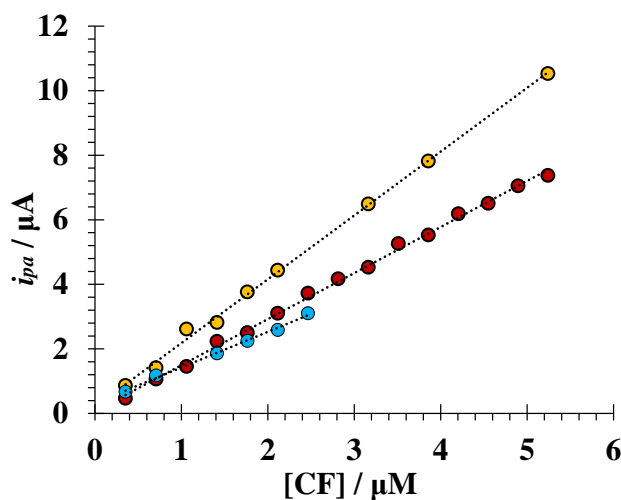




**Figura 6.4.** VC obtenidas a partir de los experimentos de concentración variable de CF en los sistemas EPC- $\beta$ -CD/  $x$   $\mu$ M CF, a) 0.2 M HCl, b) 0.2 M HClO<sub>4</sub> y c) 0.2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, donde  $x$  es una concentración variable de CF en un intervalo de 0.354 a 13.64  $\mu$ M; en una ventana de potencial de 50 a 1100 mV y una  $v$  de 100 mVs<sup>-1</sup>. El inserto presentado en cada gráfico muestra la curva de calibrado respectiva ( $i_{pa}=f([CF])$ ).

La Figura 6.5, muestra la comparación zonas de mayor linealidad de las curvas de calibrado para los tres sistemas; mientras que en la Tabla 6.2 se muestra la comparativa de los parámetros electroanalíticos obtenidos a partir del EPC y el EPC- $\beta$ -CD. A partir de estos elementos, es notable que el EPC cuenta con la menor sensibilidad y los mayores LOD y LOQ, en comparación con los obtenidos mediante EPC- $\beta$ -CD. De estos últimos, el sistema con HCl cuenta con la mejor sensibilidad, no obstante, cuenta la mayor dispersión de datos y los LOD y LOQ más altos. Por su parte, el sistema con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> cuenta con la menor sensibilidad y los menores LOD y LOQ del conjunto de sistemas, sin embargo, ya que esto podría ser causado por el corto intervalo de linealidad y la poca dispersión de los datos con la que cuenta, el sistema con HClO<sub>4</sub> resulta ser el idóneo para efectuar la cuantificaciones de CF, al contar con parámetros que se encuentran en un rango intermedio que permite tener una buena sensibilidad, así como un amplio intervalo de linealidad.





**Figura 6.5.** Curvas de calibrado ( $i_{pa}=f([CF])$ ) obtenidas a partir de experimentos de variación de concentración de CF en los sistemas EPC-β-CD/  $x$  μM CF, a) 0.2 M HCl (●), b) 0.2 M HClO<sub>4</sub> (●) y c) 0.2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (●), donde  $x$  es una concentración variable de CF en un intervalo de 0.354 a 13.640 μM ; en una ventana de potencial de 700 a 1100 mV y a una velocidad de barrido de 100 mV·s<sup>-1</sup>.

**Tabla 6.2.** Comparación de los parámetros electroanalíticos de CF obtenidos por VC en tres distintos electrolitos soporte, utilizando EPC y EPC-β-CD.

Electrodo	Solvente	Sensibilidad (μA/μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)	Intervalo de linealidad (μM)
EPC	HCl	$0.1400 \pm 0.003$ 0	$1.727 \pm 0.073$	$5.76 \pm 0.13$	$5.77 \pm 0.13 - 24.37 \pm 1.39$
	HClO <sub>4</sub>	$1.977 \pm 0.034$	$0.241 \pm 0.092$	$0.80 \pm 0.17$	$0.80 \pm 0.17 - 5.24 \pm 0.91$
EPC-β-CD	HCl	$1.428 \pm 0.019$	$0.239 \pm 0.068$	$0.80 \pm 0.13$	$0.80 \pm 0.13 - 5.24 \pm 0.77$
	HClO <sub>4</sub>	$1.428 \pm 0.019$	$0.239 \pm 0.068$	$0.80 \pm 0.13$	$0.80 \pm 0.13 - 5.24 \pm 0.77$

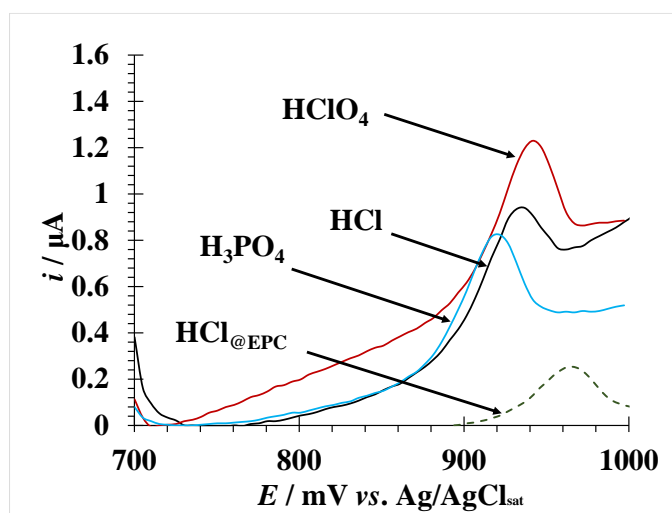


$$\text{H}_3\text{PO}_4 \quad 1.104 \pm 0.035 \quad 0.171 \pm 0.077 \quad 0.57 \pm 0.14 \quad 0.57 \pm 0.14 - 2.47 \pm 0.39$$

\*Límite de detección (LOD)= $3\sigma/m+b$  y \*\*límite de cuantificación (LOQ)= $10\sigma/m+b$

### 6.3.3. Determinación de CF en EPC-β-CD y tres electrolitos soporte distintos por VDP

Al efectuar una evaluación similar a la realizada por VC para los tres electrolitos soporte en los sistemas EPC-β-CD/3.51 μM CF, 0.2 M HCl, HClO<sub>4</sub> y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pero ahora empleando la VDP (Figura 6.6), es posible observar un comportamiento similar al anterior, en el cual, los tres perfiles voltamperométricos cuentan con una mayor corriente de respuesta, definición y potenciales menos positivos (936, 941 y 921 mV, respectivamente) que el obtenido por medio del EPC (966 mV). Este notable aumento en la corriente de respuesta del electrodo, deriva en una mejor capacidad de para llevar a cabo la determinación de CF, ya que por ejemplo, la contribución de los errores sistemáticos y aleatorios resulta minimizada.



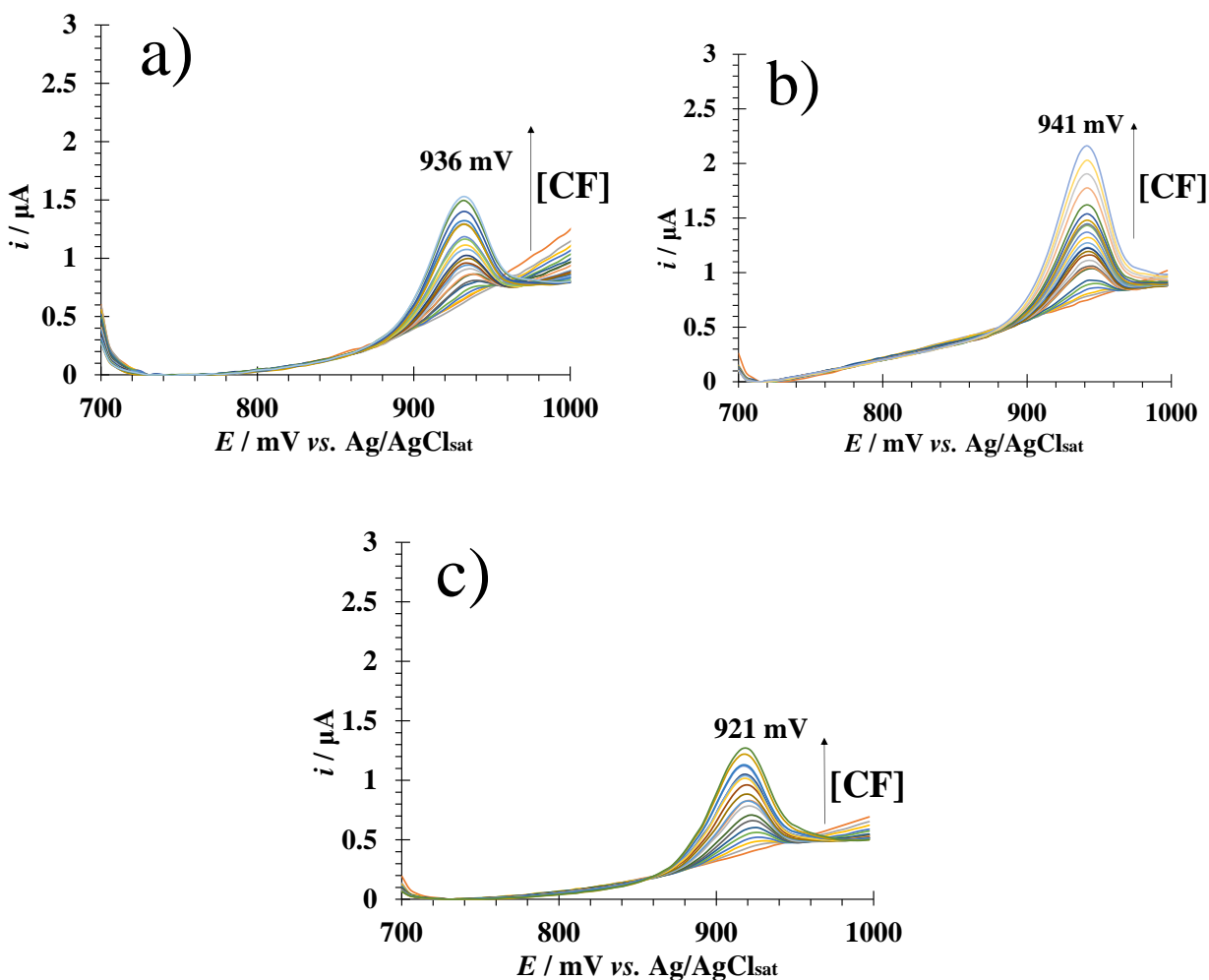
**Figura 6.6.** Comparación de los VDP obtenidos de los sistemas: EPC-β-CD/3.51 μM CF, 0.2 M HCl (—), 0.2 M HClO<sub>4</sub> (—) y 0.2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (—), con el obtenido del sistema EPC/3.51 μM CF, 0.2 M HCl (- - -).

De manera similar a lo presentado en la sección **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, la determinación de CF también es conducida por VDP en los sistemas EPC-β-CD/0.2 M en: HCl, HClO<sub>4</sub> y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,  $x$  μM CF, donde  $x$  es una concentración variable de CF en un





intervalo de 0.105 a 26.269  $\mu\text{M}$ . Las familias de VDP obtenidas de los estudios de variación de concentración son presentadas en la Figura 6.7, las cuales cuentan con claras diferencias, tanto en la forma de los perfiles voltamperométricos como en la tendencia seguida por los picos anódicos (situados en  $E_{\text{pa}}$  de 936, 941 y 921 mV, respectivamente) derivada del aumento de concentración de CF en el sistema, que además es claramente influenciado por efecto del electrolito soporte utilizado, siendo el que cuenta con  $\text{HClO}_4$  el que cuenta con el aumento más consistente.

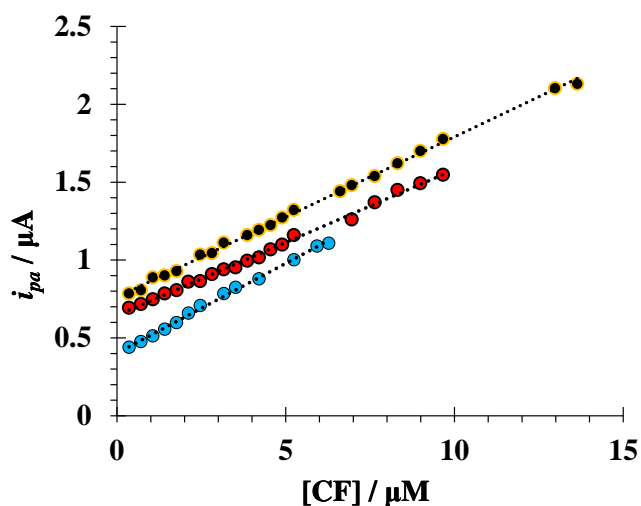


**Figura 6.7.** VDP obtenidos a partir de los estudios de concentración conducidos para CF en los sistemas EPC- $\beta$ -CD/  $x \mu\text{M}$  CF en: 0.2 M HCl, 0.2 M  $\text{HClO}_4$  y 0.2 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , donde  $x$  es una concentración variable de CF en un intervalo de 1.061 a 26.269  $\mu\text{M}$ ; en una ventana de potencial de 700 a 1100 mV, así como una amplitud de pulso de 25 mV.

Derivado de estos estudios de variación de concentración, en la Figura 6.8 se presentan las curvas de calibrado obtenidas por cada sistema, las cuales se encuentran descritas por las ecuaciones  $i_{\text{pa}}$



( $\mu\text{A}$ ) =  $(0.0936 \pm 0.0013)[\text{CF}]$  ( $\mu\text{A}$ ) +  $(0.6451 \pm 0.0065)$  ( $\mu\text{A}$ ) (HCl),  $i_{\text{pa}}$  ( $\mu\text{A}$ ) =  $(0.10290 \pm 0.00095)[\text{CF}]$  ( $\mu\text{A}$ ) +  $(0.7620 \pm 0.0061)$  ( $\mu\text{A}$ ) ( $\text{HClO}_4$ ) e  $i_{\text{pa}}$  ( $\mu\text{A}$ ) =  $(0.115 \pm 0.0019)[\text{CF}]$  ( $\mu\text{A}$ ) +  $(0.4026 \pm 0.0068)$  ( $\mu\text{A}$ ) ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), cuyos parámetros analíticos (sensibilidad, límites de detección, cuantificación, así como el intervalo de linealidad), además, son recopilados en la Tabla 6.3 y comparados con los obtenidos mediante EPC. A partir de estos parámetros, es posible advertir que de los sistemas EPC-β-CD, tanto el electrolito de  $\text{HClO}_4$ , como el de HCl cuentan con los mejores límites de detección y cuantificación, no así el electrolito de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , el cual cuenta con los con un reducido intervalo de linealidad, pues el electrodo alcanza la saturación a una concentración  $0.354 \mu\text{M}$ . Por otro lado, al efectuar la comparación entre los sistemas de estudio, es destacable que ambos (EPC y EPC-β-CD) poseen límites de detección y cuantificación similares, así como un amplio intervalo de linealidad (aunque mayor en EPC), no obstante, dado que los electrodos modificados muestran tener una sensibilidad dos veces mayor, y dado que con una mayor sensibilidad la contribución de errores aleatorios y sistemáticos es menos notable.



**Figura 6.8.** Curvas de calibrado ( $i_{\text{pa}}=f([\text{CF}])$ ) obtenidas a partir de experimentos de concentración variable de CF en los sistemas EPC-β-CD/  $x \mu\text{M}$  CF, a)  $0.2 \text{ M HCl}$  (●), b)  $0.2 \text{ M HClO}_4$  (●) y c)  $0.2 \text{ M H}_3\text{PO}_4$  (●), donde  $x$  es una concentración variable de CF en un intervalo de  $1.061$  a  $26.269 \mu\text{M}$ ; a una ventana de potencial de  $700$  a  $1100 \text{ mV}$  y una amplitud de pulso de  $25 \text{ mV}$ .



**Tabla 6.3.** Comparación de los parámetros electroanalíticos de CF obtenidos por VDP en tres distintos electrolitos soporte, utilizando un EPC-β-CD y EPC.

Electrodo	Electrolito	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ )	LOD* ( $\mu\text{M}$ )	LOQ** ( $\mu\text{M}$ )	Intervalo de linealidad ( $\mu\text{M}$ )
EPC	HCl	$0.04809 \pm 0.00040$	$1.232 \pm 0.027$	$4.10 \pm 0.17$	$4.10 \pm 0.17 - 31.75 \pm 0.79$
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	$0.1152 \pm 0.0019$	$0.3512 \pm 0.0092$	$1.170 \pm 0.056$	$1.170 \pm 0.056 - 6.27 \pm 0.29$
EPC-β-CD	HCl	$0.0940 \pm 0.0013$	$0.513 \pm 0.013$	$1.710 \pm 0.080$	$1.710 \pm 0.080 - 26.269 \pm 1.065$
	HClO <sub>4</sub>	$0.10290 \pm 0.00095$	$0.475 \pm 0.010$	$1.586 \pm 0.061$	$1.586 \pm 0.061 - 13.64 \pm 0.47$

\*Límite de detección (LOD) =  $3\sigma/m+b$  y \*\*límite de cuantificación (LOQ) =  $10\sigma/m+b$

#### 6.3.4. Validación del método para la determinación de C

A partir de los parámetros electroquímicos determinados en la subsección anterior, es posible llevar a cabo la cuantificación de CF en solución acuosa, no obstante, para que dicha cuantificación sea válida, es necesario tomar en consideración la reproducibilidad experimental de la misma en una serie de muestras preparadas independientemente, es por ello, que a continuación se presenta un análisis con base en las consideraciones contenidas en las Directrices Armonizadas para la Validación Interna de Métodos de Análisis para la validación de métodos analíticos publicadas por la IUPAC <sup>[78]</sup>, la norma mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 <sup>[79]</sup>, que establecen los requisitos para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, así como la guía para la validación de métodos analíticos cromatográficos en publicada por la SAGARPA (dado que actualmente no existe una normativa específica para la validación de métodos electroquímicos, y concretamente, para la cuantificación de cefalosporinas) <sup>[80]</sup>.

Para poder llevar a cabo la validación, es necesaria la conducción de procedimientos preliminares <sup>[80]</sup>, que la cimientan, estructuran, y sustentan, entre los que se encuentran: a) la planeación de la metodología, b) búsqueda bibliográfica de referencia para el analito de interés, que han sido



revisados previamente en el Capítulo 1, en donde se fundamenta y pone en claro la necesidad, innovación e importancia del método electroquímico en desarrollo, c) adquisición del material de referencia, obtenido con grado HPLC VETRANAL® <sup>[81]</sup>, asegurando así la minimización de errores experimentales derivados de la pureza del analito, y evitando con ello la presencia de interferentes en la experimentación; d) pruebas del método analítico, presentadas a partir del Capítulo 2, en donde se confirma la identidad del analito, se describe su comportamiento; y se lleva a cabo la determinación de los límites de detección y cuantificación con respecto al valor candidato, cuyo valor queda definido por el límite máximo permisible establecido por la FDA y la UE de 100 ng mL<sup>-1</sup> <sup>[13], [14]</sup>.

Puesto que los puntos citados previamente en documento (ídem) satisfacen los requerimientos para llevar a cabo la validación, es posible llevarla a cabo considerando los parámetros que a continuación se enlistan:

- **Confirmación de identidad**
- **Exactitud, precisión**
- **Reproducibilidad**

#### *Conformación de identidad*

Queda de manifiesto con base en los resultados electroquímicos obtenidos, que la señal de respuesta observada es atribuible únicamente a la presencia de CF, y no a otros agentes físicos o químicos del sistema. Por otro lado, dado que la naturaleza del sistema permite identificar la solamente la presencia de CF y no de interferentes, otros criterios como la selectividad (aptitud de un método para identificar al analito de interés en presencia de al menos un componente adicional de comportamiento análogo, bajo las mismas condiciones experimentales) y especificidad (aptitud de un método para responder específicamente al analito de estudio sobre otros compuestos de composición similar) del método no son aplicables bajo las condiciones establecidas.

#### *Precisión, exactitud y reproducibilidad*

La evaluación es conducida mediante criterios que consideran tanto errores aleatorios como sistemáticos que pudiesen presentarse durante la experimentación, y que estos pueden promover



un sesgo en las cuantificaciones efectuadas con respecto al valor real de la concentración del analito en una solución fortificada (siento ésta una solución blanco a la que se ha añadido una concentración conocida del analito). Esta evaluación es conducida a través de la cuantificación de CF por medio de VDP en el sistema EPC- $\beta$ -CD/  $x$   $\mu$ M CF, 0.2 M HClO<sub>4</sub>, donde  $x$  es una de tres posibles concentraciones definidas como “niveles”: 16.89 (N1), 21.64 (N2) y 26.27  $\mu$ M (N3) CF (fijadas dentro del intervalo de linealidad las curvas de calibrado presentadas en la subsección anterior). Para efectuar la cuantificación en cada uno de los tres niveles, son preparados seis blancos de manera independiente, fortificados con la concentración de un nivel seleccionado, y en los que posteriormente se lleva a cabo la medición voltamperométrica mencionada, de la cual finalmente se obtiene concentración en el sistema a través de la  $i_{pa}$  y la curva de calibrado. Para la interpretación de resultados, tres parámetros base son obtenidos: el porcentaje de recobro, % R, definido como la media aritmética de la razón entre las concentraciones obtenidas por VDP para cada una de las soluciones fortificadas y la concentración nominal del nivel de fortificación, así como su incertidumbre, definida como la media aritmética de la diferencia entre las concentraciones obtenidas de las mediciones voltamperométricas y la nominal, empleada para la fortificación de las soluciones, permitiendo en consecuencia el cálculo del coeficiente de variación por nivel, también conocida como la desviación estándar relativa, RSD (Ecuación 11), valor de utilidad para identificar si la cuantificación de CF sobre EPC- $\beta$ -CD es una actividad que puede llevarse a cabo con niveles confiables de exactitud y precisión (detallados con mayor detalle un poco más adelante). Para cada nivel (N1, N2 y N3), los valores obtenidos de % R son 88.77 %, 109.35 % y 98.90 %, mientras que los valores de las incertidumbres asociadas a % R son:  $\pm 2.40$ ,  $\pm 6.93$  y  $\pm 6.30$   $\mu$ M; valores aceptables dentro del rango  $70 \leq \% R \leq 120$  que establece SAGARPA.

Por otro lado, dado que la concentración objetivo en el sistema se encuentra cercana a 20 ppm, IUPAC, así como la Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 recomienda emplear el criterio de Horwitz (Ecuación 12) para estimar el valor ideal del coeficiente de variación ( $RSD_H$ ), el cual es un indicador en porcentaje de la razón entre de desviación estándar y la media observadas, y que para ser aceptable debe ser un valor menor a 20 % (SAGARPA). Este criterio es aplicable, ya que a medida que la concentración a cuantificar en un sistema disminuye, la posibilidad obtener un mayor sesgo en las mediciones se incrementa, respondiendo una tendencia conocida como



“trompeta de Horwitz”, presentada en la Figura 6.9, por lo que, basado en ello, el valor de  $RSD_H$  para cada uno de los niveles queda establecido como 29.56, 28.48 y 27.66 %, mientras que los valores RSD experimentales son 16.02, 29.27 y 24.25 %.

$$RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}} 100$$

Ecuación 11

Ecuación del coeficiente de variación experimental <sup>[75]</sup>.

Donde:

$\sigma$  = desviación estándar de las mediciones efectuadas en el nivel

$\bar{x}$  = media aritmética de las concentraciones en cada nivel

$$RSD_H = 2C^{-0.1505}$$

Ecuación 12

Ecuación de Horwitz para la estimación del valor óptimo del coeficiente de variación RSD <sup>[75], [78]</sup>.

Donde:

C = concentración del analito (M)

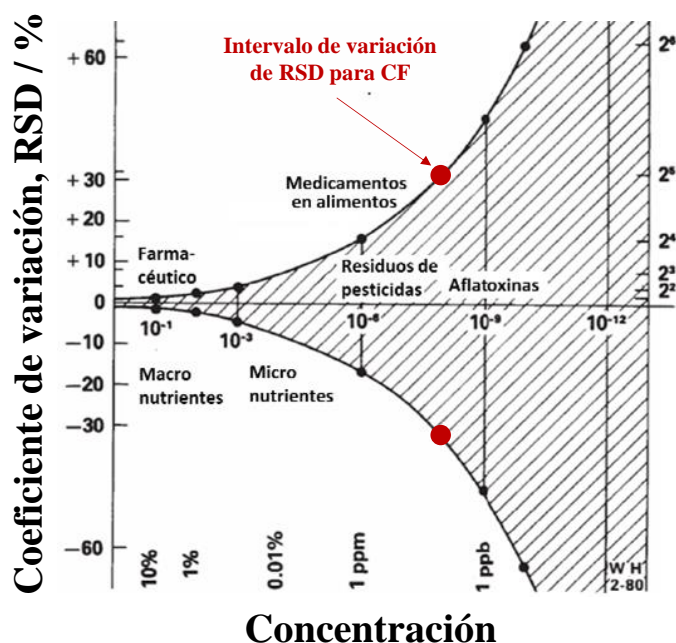


Figura 6.9. Trompeta de Horwitz [82].



Para conocer la aceptabilidad de estos valores con respecto a los obtenidos por la ecuación de Horwitz, se emplea un criterio de aceptabilidad conocido como el cociente HorRat<sup>[82]</sup>, descrito por la Ecuación 13, para la que un valor dentro de un intervalo de 0.5 a 2 se cataloga como aceptable en términos de precisión y buen desempeño por parte del laboratorio que realiza la validación. Los valores de HorRat obtenidos para cada uno de los tres niveles son 0.54, 1.03 y 0.88, por lo que los tres niveles entran dentro del margen de aceptabilidad al presentar los datos poca dispersión.

$$HorRat = \frac{RSD}{RSD_H} \quad \text{Ecuación 13}$$

Ecuación de la relación de Horwitz<sup>[82]</sup>.

La determinación de la exactitud del método (como así lo recomienda<sup>[80]</sup>), se conduce mediante una prueba *t-Student*, en donde la hipótesis nula ( $H_0$ ) considerada es la existencia de evidencia que indique diferencias significativas entre los valores de concentración observados en las mediciones y el de referencia para cada uno de los niveles (N1, N2 y N3). El valor calculado de *t*, por tanto, es obtenido a partir de la Ecuación 14, mientras que su valor crítico de *t* es obtenido de la distribución de dos colas con un valor de confianza de 95 % ( $\alpha = 0.05$ ).

$$t_{calc} = \frac{\bar{x} - x}{\sigma/\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 14}$$

Ecuación de Horwitz para la estimación del límite aceptable del coeficiente de variación RSD<sup>[75]</sup>.

Donde:

$\bar{x}$  = media aritmética de las concentraciones en cada nivel  
 $x$  = valor de concentración nominal en cada nivel  
 $\sigma$  = desviación estándar experimental  
 $n$  = número de datos empleados para el análisis

De los resultados obtenidos, los cuales son presentados en la Tabla 6.4, es posible observar que para la tertia de niveles, el valor calculado de *t* es menor su valor crítico en la distribución, por lo que  $H_0$  es rechazada, por lo que también es aceptable el método en cuanto a exactitud se refiere.

**Tabla 6.4.** Tabla con los valores de calculados y críticos de *t*, para cada uno de los niveles evaluados.

Nivel	$t_{calc}$	$t_{crítica}$	¿Aceptable?
-------	------------	---------------	-------------



1	1.93	2.57	Sí
2	0.52	2.57	Sí
3	0.11	2.57	Sí

Finalmente, dado que este conjunto de pruebas se llevan a acabo únicamente intralaboratorio es necesario evaluar la reproducibilidad por medio de un análisis  $F$ , de varianzas, en donde la hipótesis nula a evaluar es la evidencia de la existencia de diferencias significativas entre estas, por lo que el método carecería de homogeneidad, y por lo tanto quedaría invalidado. Para llevar a cabo la prueba  $F$ , primero es necesario calcular la desviación estándar de Horwitz por medio de lo dispuesto por la Ecuación 15, y finalmente la varianza elevando al cuadrado el resultado obtenido.

$$\sigma_H = \frac{RSD_H}{100} \cdot \bar{x} \quad \text{Ecuación 15}$$

Ecuación para el cálculo de la desviación estándar de Horwitz <sup>[82]</sup>.

Donde:

$RSD_H$  = coeficiente de variación de Horwitz

$\bar{x}$  = media aritmética de las concentraciones en cada nivel

De las desviaciones estándar de Horwitz calculadas por nivel, los valores obtenidos son 19.64, 45.44 y 51.65, mientras que los valores experimentales son 5.77, 88.94 y 39.69, respectivamente. El valor de  $F$  experimental ( $F_{Exp}$ ), es obtenido entonces a partir del cociente entre  $\sigma_H^2$  y  $\sigma^2$ , por lo que el valor de  $F$  por nivel es de 3.40, 1.96 y 1.30, mientras que su valor crítico, obtenido a partir  $F_{(95\%, 100, 6)}$ , es decir, un nivel de confianza del 95 %, considerando  $n = 6$  (valor experimental) y  $N \rightarrow \infty$  (criterio de Horwitz) <sup>[82]</sup>, es de 4.36, rechazando así  $H_0$  y otorgando al método el carácter aceptable en términos de reproducibilidad; por lo que el empleo de EPC-β-CD puede considerarse como factible en la cuantificación de CF en muestras sintéticas, siendo un resultado de importancia que también es una pauta para el estudio en detalle de muestras de mayor complejidad, con interferentes e inclusive muestras reales.





## 6.4. Conclusiones

Este capítulo, centrado en el desarrollo de la validación del método para la cuantificación de CF en muestras sintéticas, permite evidenciar la factibilidad de efectuar la cuantificación de CF en EPC- $\beta$ -CD, permitiendo llevar a cabo estas dentro de un amplio intervalo de concentración, y más aún, dentro de los límites máximos permisibles establecidos por instancias por la FDA y la UE como  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

El hecho de que el sistema con  $\text{HClO}_4$  como electrolito soporte haya resultado tener el mejor desempeño al contar con los mejores parámetros analíticos (tanto en VC como VDP), parece ser cuestión de que el mismo es empleado para el crecimiento de la película de  $\beta$ -CD sobre el EPC. Dicha modificación superficial, además, permite que se lleven a cabo cambios en el proceso de electrooxidación de CF, simplificando el complejo proceso visto en el Capítulo 4, hacia un proceso de transferencia másica controlado por la adsorción, por medio de la formación del complejo de inclusión CF- $\beta$ -CD, e inclusive, se incrementa la sensibilidad del electrodo, minimizando la contribución de errores tanto sistemáticos como aleatorios.



## XV REFERENCIAS

- [1] S. R. El-shaboury, G. A. Saleh, F. A. Mohamed, and A. H. Rageh, “Analysis of cephalosporin antibiotics,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 45, pp. 1–19, 2007.
- [2] Z. S. LCC, “Ceftiofur Hydrochloride Excenel® Sterile Suspension,” Kalamazoo, MI 49007, 2013.
- [3] E. A. Health, “Freedom of Information Summary Supplemental New Animal Drug Application,” 2008.
- [4] M. P. Hermo, J. Barbosa, and D. Barrón, “Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Metabolomic assays of amoxicillin , cephapirin and ceftiofur in chicken muscle : Application to treated chicken samples by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 85, pp. 169–178, 2013.
- [5] E. Flynn, *Cephalosporins And Penicillins Chemistry And Biology*, 1st. Ed. New York, United States of America: Academic Press, Inc., 1972.
- [6] United States National Library of Medicine, “Ceftiofur database from the Hazardous Substances Data Bank,” 2017.
- [7] L. K. Sørensen and L. K. Snor, “Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography,” vol. 882, pp. 145–151, 2000.
- [8] T. S. Witte, A. A. Bergwerff, P. Scherpenisse, M. Drillich, and W. Heuwieser, “Ceftiofur derivates in serum and endometrial tissue after intramuscular administration in healthy mares,” *J. theriogenology*, vol. 74, no. 3, pp. 466–472, 2010.
- [9] R. B. Morin and Gorman, “Chemistry and Biology of  $\beta$ -Lactam Antibiotics,” 1977.
- [10] F. M. Aarestrup and R. L. Skov, “Evaluation of ceftiofur and cefquinome for phenotypic detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* using disk diffusion testing and MIC-determinations,” vol. 140, pp. 176–179, 2010.

- [11] X. Zhang, Y. Wei, and Y. Ding, “Electrocatalytic oxidation and voltammetric determination of ciprofloxacin employing poly(alizarin red)/graphene composite film in the presence of ascorbic acid, uric acid and dopamine,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 835, pp. 29–36, 2014.
- [12] J. Keever, R. D. Voyksner, and K. L. Tyczkowska, “Quantitative determination of ceftiofur in milk by liquid chromatography – electrospray mass spectrometry,” vol. 794, pp. 57–62, 1998.
- [13] Pharmacia & Upjohn Co., “Freedom of information summary, Ceftiofur Sterile Suspension from Spectramast DC,” New York, United States of America, 2005.
- [14] Commission regulation (EU), “Pharmaceutically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin,” *Off. J. Eur. Union*, vol. 37|2010, no. 2377, p. 72, 2010.
- [15] G. A. Jacobson, S. Martinod, and C. P. Cunningham, “Determination of ceftiofur in bovine plasma by HPLC-DAD,” vol. 40, pp. 1249–1252, 2006.
- [16] S. Makeswaran, I. Patterson, and J. Points, “An analytical method to determine conjugated residues of ceftiofur in milk using liquid chromatography with tandem mass spectrometry,” vol. 529, pp. 151–157, 2005.
- [17] P. Amrollahi, J. S. Krasinski, R. Vaidyanathan, L. Tayebi, and D. Vashae, *Handbook of Nanoelectrochemistry*, 1st Editio. Switzerland: Springer International, 2016.
- [18] J. Wang, *Analytical electrochemistry*, Third edit. John Wiley & Sons, Inc., 2006.
- [19] I. Svancara, K. Kalcher, A. Walcarius, and K. Vytras, *Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes*, 1st Editio. CRC Press, 2012.
- [20] S. Alegret, M. del Valle, and A. Merkoçi, *Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y biosensores: curso teórico-práctico*. Univ. Autònoma de Barcelona, 2004.
- [21] M. Palomar-pardavé, S. Corona-avendaño, M. Romero-romo, G. Alarcón-angeles, and A.



- Merkoçi, “Supramolecular interaction of dopamine with  $\beta$ -cyclodextrin : An experimental and theoretical electrochemical study,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 718, pp. 103–109, 2014.
- [22] A. Abbaspour and A. Noori, “A cyclodextrin host-guest recognition approach to an electrochemical sensor for simultaneous quantification of serotonin and dopamine,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 12, pp. 4674–80, Aug. 2011.
- [23] L. Tan *et al.*, “Nanomolar detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at  $\beta$ -cyclodextrin/graphene nanocomposite platform,” *Electrochem. commun.*, vol. 12, no. 4, pp. 557–560, Apr. 2010.
- [24] A. Veseli *et al.*, “Electrochemical determination of histamine in fish sauce using heterogeneous carbon electrodes modified with rhenium (IV) oxide,” *Sensors Actuators B Chem.*, no. Iv, 2016.
- [25] T. Ramı, S. Corona-avendan, G. Alarco, G. Rosquete-pina, M. Romero-romo, and M. Palomar-pardave, “On the electrochemistry of dopamine in aqueous solution . Part I : The role of [ SDS ] on the voltammetric behavior of dopamine on a carbon paste electrode,” vol. 609, pp. 17–26, 2007.
- [26] M. T. Ramírez-Silva, M. Palomar-Pardavé, S. Corona-Avendaño, M. Romero-Romo, and G. Alarcón-Angeles, “Guest-host complex formed between ascorbic acid and  $\beta$ -cyclodextrin immobilized on the surface of an electrode,” *Molecules*, vol. 19, no. 5, pp. 5952–5964, 2014.
- [27] M. T. Ramírez-silva, M. Romero-romo, A. Rojas-hernández, and M. Palomar-pardavé, “Electrochimica Acta Influence of the HClO<sub>4</sub> concentration on the  $\beta$ -CD electropolymerization over a carbon paste electrode and on dopamine ’ s electrochemical response,” *Electrochim. Acta*, vol. 89, pp. 854–860, 2013.
- [28] S. A. Ozkan, *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 1st Editio. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015.
- [29] M. M. Abdel-Galeil, M. M. Ghoneim, H. S. El-Desoky, T. Hattori, and A. Matsuda, “Voltammetric Ciprofloxacin Sensor Based on Carbon Paste Electrodes Modified with



- Mesoporous Carbon with Enhancement Effect Using CTAB,” *J. Electrochem. Soc.*, vol. 162, no. 8, pp. H541–H550, 2015.
- [30] D. S. Guzmán Hernández, “Caracterización de parámetros fisicoquímicos de especies supramoleculares con Tenoxicam,” Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, 2014.
- [31] M. Antonio, J. Barbosa, T. Alfonso, M. Aparecido, and V. Souza, “A simple method for electroanalytical determination of ceftiofur in UHT milk samples using square-wave voltammetry technique,” *J. Appl. Electrochem.*, vol. 41, pp. 249–255, 2011.
- [32] A. Marcos, J. Barbosa, M. Aparecido, and G. Trindade, “Cathodic Stripping Voltammetry Determination of Ceftiofur Antibiotic in Formulations and Bovine Serum Determination of Ceftiofur Antibiotic,” *Anal. Lett.*, vol. 2719, no. February 2016, pp. 1143–1158, 2011.
- [33] A. Marcos, J. Barbosa, T. Alfonso, M. Araujo, De Aparecido, G. Trindade, and V. Souza, “A new indirect method based on square-wave voltammetry for ceftiofur determination in bovine milk using an alkaline degradation product,” *Microchem. J.*, vol. 98, no. 2, pp. 297–302, 2011.
- [34] A. Dolhán, A. Jelínska, and M. Bebenek, “Stability of Ceftiofur Sodium and Cefquinome Sulphate in Intravenous Solutions,” vol. 2014, 2014.
- [35] K. L. Tyczkowska, H. Street, R. D. Voyksner, K. L. Anderson, and A. L. Aronson, “Determination of ceftiofur and its metabolite desfuroylceftiofur in bovine serum and milk by ion-paired liquid chromatography,” *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, vol. 614, pp. 123–134, 1993.
- [36] K. T. Koshy and A. R. Cazars, “Controlled hydrolysis of ceftiofur sodium, a broad-spectrum cephalosporin; isolation and identification of hydrolysis products,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 86, no. 3, pp. 389–395, 1997.
- [37] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, V. Sanz-nebot, and C. Aguilar, “Improving the sensitivity of the determination of ceftiofur by capillary electrophoresis in environmental



- water samples : In-line solid phase extraction and sample stacking techniques,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 587, pp. 208–215, 2007.
- [38] S. Corona-avendaño, G. Alarcón-angeles, A. Rojas-hernández, M. A. Romero-romo, and M. T. Ram, “Study on the stability of adrenaline and on the determination of its acidity constants,” vol. 61, pp. 305–311, 2005.
- [39] D. J. Leggett, *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, 1st Ed. New York: Plenum Press, 1985.
- [40] M. T. Ramírez-Silva *et al.*, “Spectro-electrochemical and DFT study of tenoxicam metabolites formed by electrochemical oxidation,” *Electrochim. Acta*, vol. 111, pp. 314–323, 2013.
- [41] S. Corona-Avendaño, G. Alarcón-Angeles, M. T. Ramírez-Silva, G. Rosquete-Pina, M. Romero-Romo, and M. Palomar-Pardave, “On the electrochemistry of dopamine in aqueous solution . Part I: The role of [ SDS ] on the voltammetric behavior of dopamine on a carbon paste electrode,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 609, pp. 17–26, 2007.
- [42] R. Martínez, M. T. Ramírez, and I. González, “Voltammetric Characterization of Carbon Paste Electrodes with a Nonconducting Binder . Part I: Evidence of the Influence of Electroactive Species Dissolution into the Paste on the Voltammetric Response,” *Electroanalysis*, vol. 10, no. 5, pp. 336–342, 1998.
- [43] S. Corona-Avendaño, M. T. Ramírez-Silva, M. Palomar-Pardavé, L. Hernández-Martínez, M. Romero-Romo, and G. Alarcón-Angeles, “Influence of CTAB on the electrochemical behavior of dopamine and on its analytic determination in the presence of ascorbic acid - Tags: VITAMIN C DOPAMINE,” *J. Appl. Electrochem.*, vol. 40, no. 2, pp. 463–474, 2010.
- [44] E. Colín-Orozco, M. T. Ramírez-Silvia, S. Corona-Avendaño, M. Romero-Romo, and M. Palomar-Pardavé, “Electrochimica Acta Electrochemical quantification of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid using a simple carbon paste electrode modified with SDS micelles at pH 7,” *Electrochim. Acta*, vol. 85, pp. 307–313, 2012.



- [45] G. Alarcón-Angeles, S. Corona-Avendaño, M. Palomar-Pardavé, A. Rojas-Hernández, M. Romero-Romo, and M. T. Ramírez-Silva, "Selective electrochemical determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using sodium dodecyl sulfate micelles as masking agent," *Electrochim. Acta*, vol. 53, pp. 3013–3020, 2008.
- [46] D. S. Guzmán-Hernández *et al.*, "Electrochimica Acta Electrochemical characterization of tenoxicam using a bare carbon paste electrode under stagnant and forced convection conditions," vol. 59, pp. 150–155, 2012.
- [47] D. S. Guzmán-Hernández, M. Palomar-Pardavé, A. Rojas-Hernández, S. Corona-Avendaño, M. Romero-Romo, and M. T. Ramírez-Silva, "Electrochemical quantification of the thermodynamic equilibrium constant of the tenoxicam- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex formed on the surface of a poly- $\beta$  cyclodextrin-modified carbon paste electrode," *Electrochim. Acta*, vol. 140, pp. 535–540, 2014.
- [48] M. J. Dunn, S. Bergen, G. E. Hardee, K. P. Shepard, R. S. Chao, and J. L. Havens, "Crystalline Ceftiofur Free Acid," 5,721,359, 1998.
- [49] E. D. Olsen, *Métodos Ópticos de Análisis*, Primera Ed. Barcelona, España: Editorial Reverté S.A., 2001.
- [50] C. Bretti, F. Crea, C. De Stefano, C. Foti, and S. Materazzi, "Thermodynamic Properties of Dopamine in Aqueous Solution. Acid – Base Properties, Distribution, and Activity Coefficients in NaCl Aqueous Solutions at Different Ionic Strengths and Temperatures," 2013.
- [51] J. C. Anastas, P.T.; Warner, "Green Chemistry: theory and Practice, 12 Principles of Green Chemistry," *Oxford Univ. Press*, p. p.30, 1998.
- [52] D. K. J. Grosser, *Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*, 1st Ed. New York, United States of America: Wiley-VCH, 1993.
- [53] G. A. Mabbott, "An introduction to cyclic voltammetry," *J. Chem. Educ.*, vol. 60, no. 9, pp. 697–702, 1983.
- [54] E. P. Parry and R. A. Osteryoung, "Evaluation of Analytical Pulse Polarography," *Anal.*



- Chem.*, vol. 37, no. 13, pp. 1634–1637, 1965.
- [55] J. Heinze, “Book Review: Electrochemistry. Principles, Methods, and Applications. By C. M. A. Brett and A. M. O. Brett,” *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 33, no. 19, pp. 1989–1990, 1994.
- [56] K. Nikolic, M. M. Aleksic, V. Kapetanovic, and D. Agbaba, “Voltammetric and theoretical studies of the electrochemical behavior of cephalosporins at a mercury electrode,” *J. Serbian Chem. Soc.*, vol. 80, no. 8, pp. 1035–1049, 2015.
- [57] N. A. El-Maali, A. M. M. Ali, and M. A. Ghandour, “Electrochemical reduction and oxidation of two cephalosporin antibiotics: Ceftriaxone (rocephin) and cefoperazone (cefobid),” *Electroanalysis*, vol. 5, no. 7, pp. 599–604, 1993.
- [58] S. R. Gv, V. N. M, and R. Sj, “Polarografic reduction behavior of some antibiotic cephalosporins,” *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 4, pp. 12–15, 2010.
- [59] B. Feier, A. Gui, C. Cristea, and R. Săndulescu, “Electrochemical determination of cephalosporins using a bare boron-doped diamond electrode,” *Anal. Chim. Acta*, p. 31, 2017.
- [60] N. Erk, B. Uslu, N. Yılmaz, I. Biryol, and A. O. Sibel, “Study on electrooxidation of cefadroxil monohydrate and its determination by differential pulse voltammetry,” vol. 23, pp. 263–273, 2000.
- [61] N. Abo, A. Ghandour, and M. Kauffmann, “Cephalosporin antibiotics at carbon paste and modified carbon paste electrodes in both aqueous and biological media,” vol. 38, pp. 91–97, 1995.
- [62] H. Fabre, M. D. Blanchin, and U. Tjaden, “High-performance Liquid Chromatography with Anodic Amperometric Detection for the Determination of Cefotaxime and its Metabolites,” vol. 111, no. November, pp. 1281–1284, 1986.
- [63] R. A. Dubrovskii and E. A. Aksiment, “Anodic Synthesis and Properties of Polyaminothiazole,” vol. 44, no. 2, pp. 252–255, 2008.





- [64] H. M. Fahmy and R. Fondamentale, “Electrochemical oxidation of substituted thiazoles: 2-Amino-4-ethoxycarbonyl-5- methylthiazole and N-ethoxycarbonyl-N’-(4-ethoxycarbonyl-5-methylthiazol-2-YL) Thiourea,” vol. 24, pp. 391–394, 1979.
- [65] A. J. Bard, L. R. Faulkner, E. Swain, and C. Robey, *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*, 2nd. Ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [66] L. N. Klatt and D. R. Lewis, “Calculations concerning the measurability of the potential dependence of the charge transfer coefficient by direct current polarography,” *Anal. Chem.*, vol. 46, no. 1, pp. 24–29, 1974.
- [67] L. Camacho, “The Transfer Coefficient of the Electrochemical Reduction of Cephalosporins and Cefamycins,” vol. 5, pp. 325–331, 1993.
- [68] A. Methods, M. R. Majidi, K. Asadpour-zeynali, and B. Hafezi, “Electrocatalytic oxidation and determination of ceftriaxone sodium antibiotic in pharmaceutical samples on a copper hexacyanoferrate nanostructure,” *Anal. Methods*, vol. 3, no. 146, pp. 646–652, 2011.
- [69] R. Guidelli, R. G. Compton, J. M. Feliu, and E. Gileadi, “Defining the transfer coefficient in electrochemistry : An assessment ( IUPAC Technical Report ) 1,” vol. 86, no. 2, pp. 245–258, 2014.
- [70] A. Meulemans, F. Paycha, P. Hannoun, and M. Vulpillat, “Measurement and Clinical and Pharmacokinetic Implications of Diffusion Coefficients of Antibiotics in Tissues,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 33, no. 8, pp. 1286–1290, 1989.
- [71] K. Balaji, K. Reddaiah, T. M. Reddy, and S. R. J. Reddy, “Voltammetric Reduction Behavior and Electrode Kinetics,” vol. 29, no. 3, pp. 177–185, 2011.
- [72] J. L. Casilla, M. Martinez, F. Addo-Yobo, and J. Aracil, “Modelling of the adsorption of Cephalosporin C on modified resins in a stirred tank,” *Chem. Er&neering Journal*, 52, vol. 52, pp. 71–75, 1993.
- [73] A. K. N. R. John O’M. Bockris, *Modern Electrochemistry 2A: Fundamentals of Electrodics*, Segunda ed. New York: Publishers, Plenum.



- [74] Z. N. Gao, X. L. Wen, and H. L. Li, “Study of the Inclusion Complexes of Catecholamines with beta-Cyclodextrin by Cyclic Voltammetry,” *Pol. J. Chem.*, vol. 76, no. 7, pp. 1001–1007, 1978.
- [75] S. Sandoval, “Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición,” *Zhurnal Eksp. i Teor. Fiz.*, p. 66, 2010.
- [76] E. Laviron, “.,” *Bull. Soc. Chim. Fr.*, vol. 10, p. 3717, 1962.
- [77] L. A. Currie, “Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995),” *Anal. Chim. Acta*, vol. 391, no. 2, pp. 105–126, 1999.
- [78] M. Thompson, S. L. R. Ellison, and R. Wood, “Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 74, no. 5, pp. 835–855, 2002.
- [79] Comité Técnico de de Normalización Nacional de Sistemas de Gestión de la Calidad y Evaluación de la Conformidad, “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.” Instituto Mexicano de Normalización y Certificación A.C., p. 39, 2006.
- [80] D. General, D. E. I. Agroalimentaria, and A. Y. Pesquera, “Guía de validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en productos vegetales por espectrometría de masas / masas CNRPYC / 2017 GVM / Rev01 Página 2,” pp. 1–14, 2017.
- [81] Sigma-Aldrich, “Ficha de datos de seguridad de Clorhidrato de Ceftiofur,” Toluca, México, 2018.
- [82] C. A. Rivera and M. R. Rodríguez, “Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayos NMX-EC-17025-IMNC-2006,” *Simp. Metrol. 2010*, pp. 1–8, 2010.
- [83] S. Kumar, “Spectroscopy of Organic Compounds,” *Dept. Chem.*, vol. 66, pp. 1–36, 2006.
- [84] BASi®, “BASi® | Linear Sweep Voltammetry/Cyclic Voltammetry,” *Setting Up a Linear*



- Sweep/Cyclic Voltammetry Experiment*, 2018. [Online]. Available: [https://www.basinc.com/manuals/EC\\_epsilon/Techniques/CycVolt/cv](https://www.basinc.com/manuals/EC_epsilon/Techniques/CycVolt/cv). [Accessed: 15-Jan-2018].
- [85] BASi®, “BASi® | Pulse Voltammetric Techniques,” *Pulse Voltammetric Techniques*, 2018. [Online]. Available: [https://www.basinc.com/manuals/EC\\_epsilon/Techniques/Pulse/pulse](https://www.basinc.com/manuals/EC_epsilon/Techniques/Pulse/pulse). [Accessed: 15-Jan-2018].
- [86] BASi®, “BASi® | Chronoamperometry/chronocoulometry,” *Chronoamperometry/chronocoulometry*, 2018. [Online]. Available: [https://www.basinc.com/manuals/EC\\_epsilon/Techniques/ChronoI/ca](https://www.basinc.com/manuals/EC_epsilon/Techniques/ChronoI/ca). [Accessed: 15-Jan-2018].



## XVI Anexo A: espectrofotometría UV-Vis y SQUAD

### *Espectrofotometría UV-Vis*

La espectrofotometría UV-Vis estudia los cambios en los niveles energéticos dentro de moléculas (principalmente), debido a la transferencia y liberación energética de electrones localizados en enlaces  $\pi$  u orbitales antienlace, producida por la interacción con una fuente de luz dentro de un intervalo de longitudes de onda de 200 a 800 nm, es decir, el intervalo en donde se encuentra el espectro ultra violeta cercano y el espectro visible. La información que se obtiene a partir de la aplicación de esta técnica es comúnmente acerca de sistemas con electrones  $\pi$ , insaturaciones conjugadas, así como compuestos aromáticos, nano partículas (en el caso de plasmones de resonancia), entre otros [83].

#### *Reglas empíricas de J. R. Dyer para la identificación bandas de absorción*

La identificación de las bandas de absorción, por medio de las  $\lambda_{\max}$  en un espectro UV cercano puede llevarse a cabo para compuestos orgánicos del tipo  $R-C_6H_4-COX$  o compuestos aromáticos de composición similar, que cuenten además en su estructura con grupos auxóchromos. Esta identificación puede lograrse con base en reglas empíricas propuestas por J. R. Dyer [49] que a continuación se enlistan, las cuales cuentan con la característica de dar una mayor énfasis a los efectos debidos a grupos auxóchromos (que producen efectos batocrómicos o hipsocrómicos en los valores de  $\lambda_{\max}$ ), que en suma proporcionan un valor aproximado del valor de los máximos de absorción [49].

- 1. Se asigna el valor base de 250 nm, cuando  $X=H$ , 246 nm o cuando  $X$ =alquilo o resto de anillo y 230 nm cuando  $X= -OH$  o  $O$ -alquilo.*
- 2. Se suman 3 nm cuando  $R$  es un resto de anillo o un grupo alquilo en orto o meta.*
- 3. Se suman 10 nm cuando  $R$  es un resto de anillo o un grupo alquilo en para.*
- 4. Se suman 7 nm cuando  $R$  es un sustituyente  $-OH$ ,  $-OMe$  o  $O$ -alquilo en orto o meta.*
- 5. Se suman 25 nm cuando  $R$  es un sustituyente  $-OH$ ,  $-OMe$  o  $O$ -alquilo en para.”*

(Eugene D. Olsen. Métodos Ópticos de Análisis (1990)).

**Tabla A.1.** Máximos de absorción en el ultravioleta cercano para algunos bencenos monosustituídos, en disolución acuosa J. R. Dyer (Applications of absorption spectroscopy of organic compounds, p. 18, Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs. N. J. (1965).

$C_6H_5X$ donde $-X$ es	Banda primaria		Banda secundaria	
	$\lambda_{max}$ (nm)	$\epsilon$	$\lambda_{max}$ (nm)	$\epsilon$
-H	203.5	7400	254	204
-NH <sub>3</sub>	203	7500	254	169
-CH <sub>3</sub>	206.5	7000	261	225
-I	207	7000	257	700
-Cl	209.5	7400	263.5	190
-Br	210	7900	261	192
-OH	210.5	6200	270	1450
-OCH <sub>3</sub>	217	6400	269	1480
-CO <sub>2</sub> H	230	11600	273	970
-NH <sub>2</sub>	230	8600	280	1430
-COCH <sub>3</sub>	245.5	9800		
-CHO	249.5	11400		
-NO <sub>2</sub>	268.5	7800		

### Funcionamiento de SQUAD

Una vez los datos necesarios son alimentados al SQUAD, el programa calcula las fracciones molares para cada especie a través del valor número de constantes de formación alimentadas, para enseguida calcular la concentración asociada (empleando el dato de la concentración total ingresada) a cada especie a lo largo del intervalo de pH o p $\beta$ -CD indicado. Una vez obtenidas estas concentraciones, las absorbancias alimentadas para cada pH son utilizadas para llevar a cabo la determinación de los coeficientes de absortividad molar, que corresponden a cada una de las especie química en el sistema, siguiendo para ello lo dispuesto en la ley de Lambert-Beer (ya que esta considera la longitud de paso óptico de la celda espectrofotométrica) y aditividades, y determinando la precisión entre estos valores teóricos y experimentales (a través de la desviación estándar,  $\sigma$ ), así como la exactitud de los mismos (a través de la suma de cuadrados,  $U^2$ ). Si estas dos últimas cantidades resultan tener una gran desviación con respecto al valor experimental, SQUAD lleva a cabo una iteración de estos resultados ajustando los valores de las constantes de acidez hacia valores que aminoren tales desviaciones, hasta el punto en el que éstas no cambien de manera significativa, o dicho en otras palabras, converjan y el error sea mínimo.



Con esta información obtenida a partir de este ajuste (constantes, coeficientes de absorptividad molar, desviaciones estándar [de los coeficientes y total en el ajuste] y suma de cuadrados), es posible construir el diagrama de distribución de especies, así como la conducir la comparación de los espectros de absorción teóricos y experimentales con el propósito de evaluar la calidad del ajuste.



## XVII Anexo B: Técnicas electroquímicas

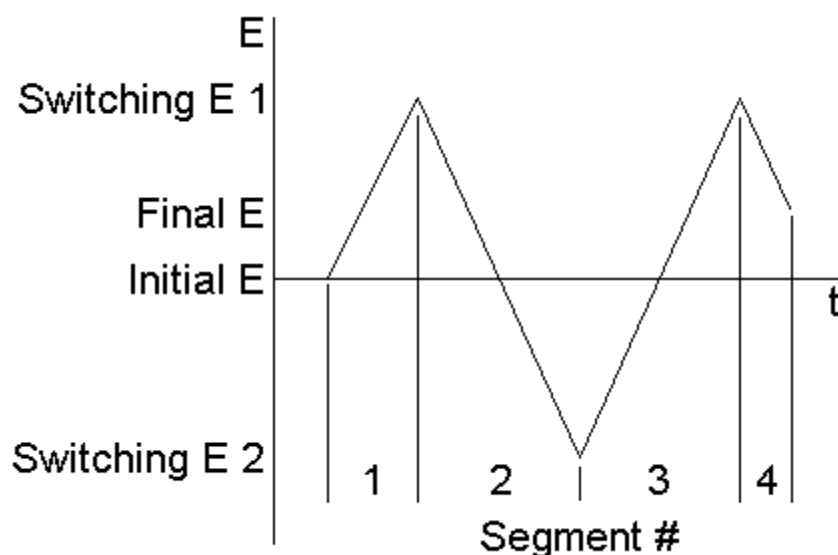
### *Voltamperometría lineal (LSV)*

La LSV es la técnica voltamperométrica más sencilla que utiliza una onda lineal de potencial que se desarrolla de manera lineal en el tiempo. En ella se fija un intervalo de potencial de inicio y un potencial de término (ventana de potencial) dentro del cual se aplicará el barrido. Muchas de las aplicaciones de la LSV asociadas la VC <sup>[84]</sup>.

### *Voltamperometría cíclica (VC)*

La VC es la técnica más comúnmente empleada para adquirir información cualitativa acerca de reacciones electroquímicas. El alcance de la misma resulta de la facilidad y rapidez con que es posible obtener información acerca de la transferencia másica de un sistema, así como cinética de procesos redox de manera rápida y a través de transferencia de carga heterogénea entre un conductor electrónico y uno iónico.

La VC (a diferencia de la LSV que consiste en un barrido lineal o escalonado de potencial, aplicado en un electrodo de trabajo, utilizando para ello una onda de potencial triangular (Figura B.1), obteniendo como respuesta una corriente debida a las especies conductoras de la solución y generando así curvas  $i=f(E)$  denominadas como voltamperogramas. Dependiendo de la información que provean éstos, un solo o múltiples barridos pueden ser llevados a cabo para extraer la información electroquímica que se requiera. Una de sus aplicaciones más importantes se encuentra en el diagnóstico cualitativo de las reacciones electroquímicas que suceden en un proceso redox, o reacciones químicas que lo preceden, así como la determinación de parámetros electroquímicos de los analitos electroactivos. Los mecanismos de reacción son comúnmente clasificados como E y C, es decir, procesos electroquímicos o químicos, respectivamente, y su presencia puede ser advertida con respecto a los cambios observados en los voltamperogramas <sup>[18]</sup>, <sup>[84]</sup>.



**Figura B.1.** Onda triangular de la Voltamperometría Cíclica <sup>[84]</sup>.

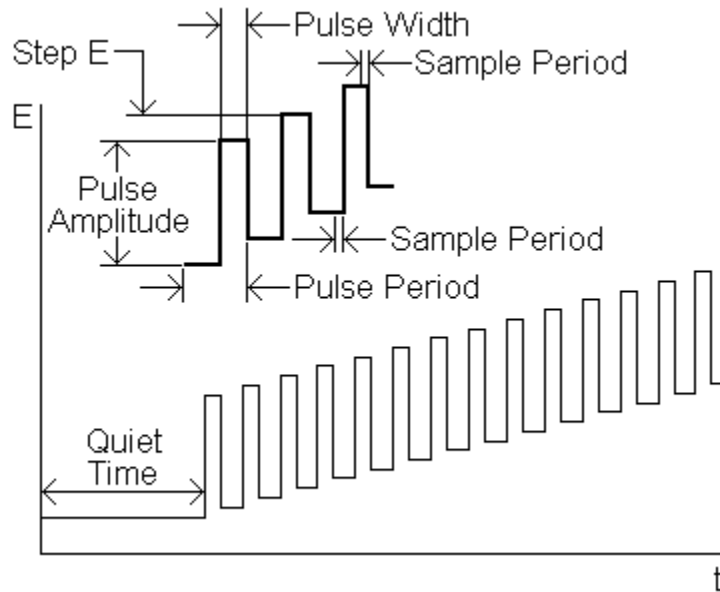
### *Voltamperometría diferencial de pulso (VDP)*

La VDP es una técnica de excelencia para llevar a cabo cuantificaciones en nivel de trazas de especies orgánicas, metalorgánicas e inorgánicas, debido a que con ella se minimiza la contribución de la corriente capacitiva generada por el electrolito soporte. Está basada en la aplicación de pulsos de potencial en un electrodo de trabajo, con magnitud fija y en una rampa de potencial lineal, justo antes de la interrupción de potencial por un tiempo determinado y la subsecuente imposición de un segundo pulso aplicado con un delta de potencial (Figura B.2). La corriente se muestrea dos veces durante este proceso, durante la aplicación del pulso y durante el periodo en donde cesa la aplicación del potencial. El VDP resultante es consiste entonces de picos de corriente que están directamente relacionados con la concentración del o los analitos en solución. La VDP puede alcanzar mediciones de concentración tan bajas como  $10^{-8}$  (ppb o  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). La amplitud del pico, además, está relacionada con la estequiometría electrónica de la reacción electroquímica por medio de la amplitud de los picos obtenidos. Amplitudes de pulso de 25 a 50 mV son las más comúnmente empleadas y por ejemplo, derivado de su aplicación en sistemas irreversibles como el caso del presente documento, es de esperar picos de corrientes pequeñas y forma ancha, proveyendo





información acerca de la forma química en la que un analito puede aparecer, es decir, su estado de oxidación, complejación, entre otros <sup>[18]</sup>.

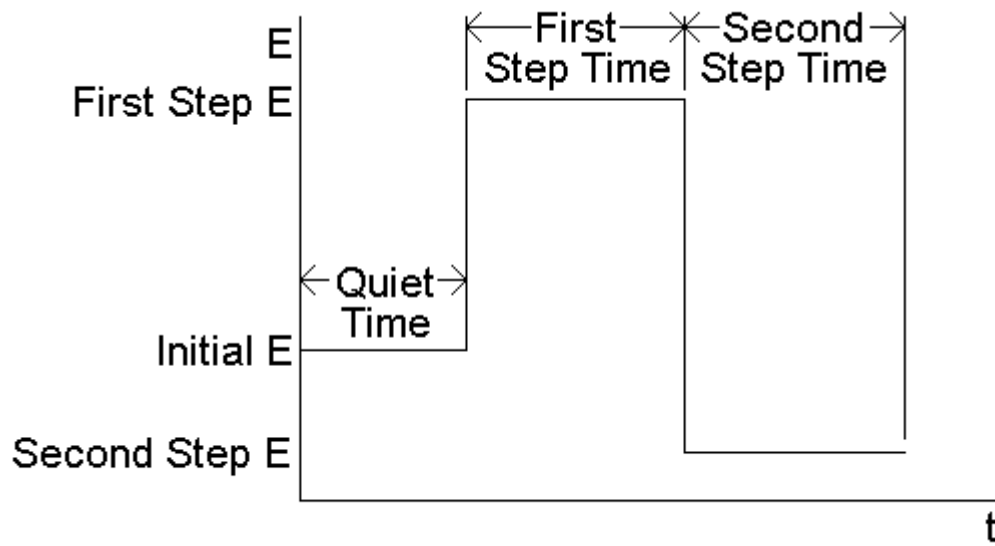


**Figura B.2.** Onda de potencial de la Voltamperometría Diferencial de Pulso <sup>[85]</sup>.

### *Cronoamperometría (CA)*

La CA es una técnica electroquímica que involucra la imposición de potencial sobre un conductor electrónico que se encuentra en contacto con un conductor iónico en estado estacionario por un tiempo determinado, desde un valor en el cual no ocurren reacciones faradáicas, hasta un valor lo suficientemente positivo o negativo (según el analito) para generar un gradiente de concentración del analito en la interface, oxidándola o reduciéndola hasta un valor en el cual la concentración del analito tiende a ser efectivamente cero. Derivado de la aplicación de la técnica, se obtiene una curva corriente-tiempo denominada como cronoamperograma, la cual refleja el cambio en el gradiente de concentración en la cercanía de la superficie del electrodo (Figura B.3) <sup>[65]</sup>.





**Figura B.3.** Onda de potencial de la Cronoamperometría <sup>[86]</sup>.

